UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE
Instytut Nauk Biologicznych

Justyna Helena Kapral-Piotrowska

Interakcje pochodnej kwercetyny – lenzozydu Aβ z błonami i ich korelacje z biologicznymi efektami na komórki

Interactions of quercetin derivative – lensoside Aβ with membranes and their correlations with biological effects on the cells

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Bożena Pawlikowska-Pawlęga, prof. UMCS

Lublin, 2020

ROZPRAWA DOKTORSKA

Pragnę serdecznie podziękować Pani Promotor dr hab. Bożenie Pawlikowskiej-Pawlędze za powierzenie ciekawego tematu, nieocenioną pomoc merytoryczną, cenne wskazówki, a także za poświęcony czas i zaangażowanie.

Pragnę również podziękować prof. dr hab. Wiesławowi I. Gruszeckiemu za cenne sugestie i wskazówki dotyczące prawidłowej interpretacji wyników.

Dziękuję wszystkim pracownikom, koleżankom i kolegom z Katedry Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii UMCS, za życzliwość i miłą atmosferę podczas realizacji badań.

Dziękuję najbliższym za wsparcie, cierpliwość i wiarę we mnie.

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie opublikowano w artykule: Pawlikowska-Pawlęga B., Kapral-Piotrowska J., Gawron A., Stochmal A., Żuchowski J., Pecio Ł., Luchowski R., Grudziński W., Gruszecki W.I., 2018, Interaction of quercetin derivative – lensoside A <beta> with liposomal membranes, *BBA – Biomembranes*, 1860, 292-299 (IF =3,498, Pkt_{MNiSW}=35).

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów

A549 - linia komórkowa ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc

ABP280 - białko wiążące aktynę 280, filamina A

A/H1N1 - podtyp wirusa grypy typu A

A/H3N2 - podtyp wirusa grypy typu A

AIDS - zespół nabytego niedoboru odporności

AP-1 - czynnik transkrypcyjny, białko aktywujące 1

ATP - adenozyno-5′-trifosforan

B - typ wirusa grypy

Bad - białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2

Bak - proapoptotyczne biało z rodziny białek Bcl-2

Bax - białko z rodziny genowej Bcl-2

Bcl-2 - białko blokujące apoptozę

Bcl-xL - białko blokujące apoptozę z rodziny Bcl-2

BK_{Ca} - kanały potasowe o dużym przewodnictwie aktywowane jonami Ca^{2+}

Caco-2 - ludzka linia komórkowa gruczolaka okrężnicy

cAMP - cykliczny adenozyno-3′,5′-monofosforan

CD24 - klaster różnicowania 24

CD44 - klaster różnicowania 44

CDK - kinazy zależne od cytokin

CFTR - błonowy regulator przewodnictwa, białko tworzące kanał chlorkowy

cGMP - cykliczny guanozyno-3′,5′-monofosforan

CHO - linia komórkowa unieśmiertelnionych komórek jajnika chomika chińskiego

COX - cyklooksygenaza

CYP1A - podrodzina enzymów cytochromu P-450

CYP1A2 - podrodzina enzymów cytochromu P-450

D_2O - tlenek deuteru, woda ciężka

DHR123 - dihydrorodamina 123

DMPC - dimirystylofosfatydylocholina

DMSO - dimetylosulfotlenek

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

DPPC - dipalmitylofosfatydylocholina

DSC - różnicowa kalorymeria skaningowa

ECG - epigalokatechina

ECM - macierz zewnątrzkomórkowa

EGCG - galusan epigalokatechiny

EGFR - receptor czynnika wzrostu naskórka

EPR - elektronowy rezonans paramagnetyczny

FAK - kinaza płytek przylegania, cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa

FBS - płodowa surowica bydlęca

FLIM - mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji

FTIR - spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera

GPI - glikofosfatydyloinozytol

GUV - wielkie jednowarstwowe liposomy

HA22T/VGH - odróżnicowana ludzka linia wątrobiaka

HDL - lipoproteina o wysokiej gęstości

HeLa - linia komórkowa ludzkiego raka szyjki macicy

Hep2 - linia komórkowa ludzkiego nowotworu nabłonkowego krtani

HepG2 - linia komórkowa ludzkiego nowotworu wątroby

HIV - ludzki wirus niedoboru odporności

HL-60 - linia komórkowa ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej

HSF - linia ludzkich fibroblastów skóry człowieka

HSP - białka szoku cieplnego

HSV - wirus opryszczki pospolitej

HUVEC - linia komórkowa ludzkich komórek śródbłonka żyły pępowinowej

IGF-1 - insulinopodobny czynnik wzrostu

IAA - kwas indolilo-3-octowego

IL-1β - interleukina 1β

IL-6 - interleukina 6

IL-8 - interleukina 8

iNOS - syntaza tlenku azotu

IUPAC - Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej

Lα - faza ciekłokrystaliczna

LAβ - lenzozyd Aβ

Lβ - faza żelowa

Lc - faza krystaliczna

LDL - lipoproteina o niskiej gęstości

LOX - lipooksygenaza

LPS - lipopolisacharyd

LUV - duże jednowarstwowe liposomy

MCF-7 - linia komórkowa ludzkiego raka piersi

MCF-7/ADR - linia komórkowa raka piersi odporna na doksorubicynę

MDA-MB-231 - linia komórkowa potrójnie ujemnego gruczolakoraka piersi

MDR - oporność wielolekowa

$mitoBK_{Ca}$ - mitochondrialne kanały potasowe o dużym przewodnictwie aktywowane jonami Ca^{2+}

$mitoK_{ATP}$ - mitochondrialne kanały potasowe aktywowane ATP

MLC - lekki łańcuch miozyny

MLCK - kinaza lekkich łańcuchów miozyny

MLV - liposomy wielowarstwowe

MMP - metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej

mRNA - matrycowy RNA

MRP-1 - białko oporności wielolekowej

MVV - wielopęcherzykowe liposomy

NF-κB - jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B

NMR - jądrowy rezonans magnetyczny

NO - tlenek azotu

$O_2^{\bullet -}$ - anionorodnik ponadtlenkowy

$OH^{\bullet}$ - rodnik hydroksylowy

OLV - liposomy kilkuwarstwowe

p21 - inhibitor kinaz zależnych cyklin

P338 - linia komórkowa mysiej białaczki

p53 - czynnik transkrypcyjny indukujący ekspresję genów proapoptotycznych

Pβ - pofałdowana faza żelowa

PBS - roztwór soli fizjologicznej

PC - fosfatydylocholina

PCK - kinaza białkowa C

PDGFR - receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu

PE - fosfatydyloetanoloamina

PG - fosfatydyloglicerol

pH - skala pomiarowa, ujemny dziesiętny logarytm stężenia jonów wodorowych w roztworze

PI - fosfatydyloinozytol

PIP3 - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu

PKC - białkowa kinaza C

PM 701 - substancja o działaniu przeciwnowotworowym, naturalny produkt pochodzący z moczu wielbłąda

PS - fosfatydyloseryna

PTK - białkowa kinaza tyrozynowa

Q-7-MeGlu - glikozydowa pochodna kwercetyny uzyskana w wyniku biotransformacji przez grzyba *Beauveria bassiana*.

RNA - kwasy rybonukleinowy

ROS - reaktywne formy tlenu

RPMI - podłoże wzrostowe i utrzymujące stosowane do hodowli komórek

RSV - syncytialny wirus nabłonka oddechowego

SEM - elektronowy mikroskop skaningowy

SGLT-1 - kotransporter glukozowo-sodowy

SM - sfingomielina

SUV - małe jednowarstwowe liposomy

SV40 - Simian wirus, wirus należący do poliomawirusów

TIG-1 - linia embrionalnych fibroblastów z płuc ludzkich

T_m - temperatura głównego przejścia fazowego

TNF-α - czynnik martwicy nowotworu

U937 - linia komórkowa ludzkiej białaczki monoblastycznej

UV - promieniowanie ultrafioletowe

UVs - liposomy jednowarstwowe

VEGFR - receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego

Streszczenie

Lenzozyd Aβ (kwercetyna-3-O-[6-O-E-kofeilo)-β-D-glukopiranozylo(1→2)]-β-D galaktopiranozylo-7-O-β-D-glukuropiranozyd) jest pochodną kwercetyny i należy do flawonoidów, związków powszechnie występujących w roślinach. W ostatnim czasie flawonoidy stały się przedmiotem licznych badań ze względu na ich różne właściwości biologiczne i farmakologiczne. Badania *in vitro*, jak *in vivo* potwierdzają ich pozytywne działanie, zarówno na poziomie komórki jak i całego organizmu. Mają one m.in. działanie przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe, antyalergiczne i inne. Szczególnie istotna jest ich aktywność przeciwnowotworowa. Jednym z miejsc oddziaływania flawonoidów jest błona komórkowa. Jednocześnie lenzozyd Aβ jest nowo wyizolowanym związkiem z nadziemnych części soczewicy jadalnej (*Lens culinaris*) odmiany *Tina,* a do tej pory jest bardzo mało danych literaturowych na temat metabolitów wyizolowanych z liści i łodyg tej rośliny.

Głównym celem pracy doktorskiej było określenie zdolności lenzozydu Aβ do wchodzenia w interakcje z błonami (zarówno z lipidami i białkami błonowymi), określenie sposobu oddziaływania tego związku na membrany, poznanie lokalizacji i orientacji flawonoidu w błonach oraz ocena skutków jego działania na komórki. Aby wyjaśnić sposób interakcji flawonoidu z błonami oraz potwierdzić wpływ tych oddziaływań na zdrowe i nowotworowo zmienione komórki, posłużono się różnorodnymi metodami badawczymi takimi jak: absorpcyjna spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), jądrowy rezonans magnetyczny (^{1}H NMR), różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC), mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM), patch-clamp, transmisyjna i skaningowa mikroskopia elektronowa (TEM, SEM), mikroskopia świetlna, mikroskopia fluorescencyjna i cytometria przepływowa. W doświadczeniach zastosowano różne modele badawcze takie jak liposomy wielowarstwowe (MLV), wielkie jednowarstwowe liposomy (GUV) sporządzone z dipalmitylofosfatydylocholiny (DPPC) oraz hodowle komórek *in vitro*: linie nowotworowe raka szyjki macicy (HeLa) i raka krtani (Hep-2) oraz linię prawidłową fibroblastów skóry człowieka (HSF).

W badaniach wykazano, że lenzozyd Aβ istotnie wpływa na modelowe błony sporządzone z DPPC. Wbudowuje się do liposomów i wiąże się z głowami polarnymi

lipidów za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy ugrupowaniem C–O–P–O–C a grupami hydroksylowymi flawonoidu.

Ponadto, wyniki otrzymane technikami ^{1}H NMR i DSC ujawniły, że badany flawonoid działa usztywniająco na błony DPPC oraz powoduje zmianę ich właściwości fizycznych. Stwierdzono niewielkie obniżenie temperatury przejścia fazowego, zanik przedprzejścia fazowego oraz obniżenie entalpi kalorymetrycznej i kooperatywności przejścia. Zastosowanie techniki FLIM wykazało planarną orientację badanego związku w stosunku do płaszczyzny dwuwarstwy lipidowej. Z kolei dzięki technice patch-clamp udało się stwierdzić modulujące działanie flawonoidu w stosunku do białek transportowych. Lenzozyd Aβ zmieniał bowiem aktywność kanałów potasowych komórek fibroblastów skóry człowieka, co przejawiło się ich zwiększonym otwieraniem się.

Badania za pomocą techniki FTIR wykonane na komórkach z hodowli *in vitro* potwierdziły, że badany związek oddziałuje, na poziomie molekularnym, zarówno z białkami jak i lipidami tych komórek. Badany flawonoid wchodzi w interakcje z głowami cholinowymi fosfolipidów komórek HeLa i Hep-2 poprzez tworzenie wiązań wodorowych z grupami – PO_2^- oraz ugrupowaniem C-O-P-O-C głów polarnych. Lenzozyd Aβ wyraźnie wpływa także na profil spektralny białek z regionu amidu I, co przejawiło się zmianami ich struktury drugorzędowej oraz obniżeniem ich ilości. Odmiennie oddziałuje na komórki prawidłowe linii HSF indukując wytworzenie dodatkowych białek przez te komórki i powodując niewielkie działanie usztywniające frakcji lipidowej głów cholinowych.

Wyniki uzyskane, za pomocą testu czerwieni obojętnej oraz testu LIVE/DEAD ujawniły, zależne od linii komórkowej obniżenie żywotności komórek. Wykazano, że lenzozyd Aβ w niewielkim stopniu wpływa na przeżywalność komórek. Najsilniej działa na komórki raka szyjki macicy człowieka. Jego cytotoksyczne działanie, skorelowane jest, z indukcją apoptozy w komórkach nowotworowych linii HeLa i Hep-2 zaś fibroblasty skóry człowieka nie są wrażliwe na działanie badanego flawonoidu.

Analizy komórek z użyciem techniki mikroskopii elektronowej transmisyjnej i skaningowej jak również mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej ujawniły skutki działania lenzozydu Aβ na komórki nowotworowe. Obserwowano zmiany ich kształtu, powierzchni, parametrów morfometrycznych i ultrastruktury. Komórki posiadały cechy charakterystyczne dla komórek apoptotycznych takie jak: obkurczenie komórek i jąder, redukcja lub utrata mikrokosmków, pofragmentowanie chromatyny, silna wakuolizacja cytoplazmy, obecność autolizosomów, obecność uwpukleń błony oraz pojawienie się ciałek

apoptotycznych. Jednocześnie lenzozyd Aβ nie zmienił morfologii oraz ultrastruktury fibroblastów skóry człowieka.

Ostatni etap badań obejmował określenie wpływu LAβ na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach. Badania wykazały dualistyczne działanie związku. Flawonoid indukował stres oksydacyjny w komórkach linii HeLa i Hep-2 i jednocześnie wykazał działanie antyutleniające w stosunku do komórek prawidłowych skóry człowieka.

Podsumowując, wyniki zawarte w rozprawie potwierdziły oddziaływanie lenzozydu Aβ na błony komórkowe. Flawonoid wchodząc w interakcje z białkami i lipidami komórek, w tym lipidami membran, zmienia ich dynamiczne i strukturalne właściwości. W efekcie, jako skutki oddziaływania flawonoidu, obserwuje się inną niż w kontrolnych komórkach nowotworowych, morfologię i ultrastrukturę, w większości, zgodną z fenotypem komórek apoptotycznych. Jednocześnie związek nie indukuje apoptozy w komórkach prawidłowych, nie wykazuje działania cytotoksycznego wobec nich i wzmaga w nich syntezę białek. Takie właściwości lenzozydu Aβ czynią go potencjalnym środkiem terapeutycznym, samodzielnym lub stosowanym w terapii skojarzonej.

Słowa kluczowe:

flawonoidy, liposomy, komórki nowotworowe, mikroskopia elektronowa, FTIR

Summary

Lensoside Aβ (quercetin 3-O-[6-OE-caffeyl)-β-D-glucopyranosyl(1→2)]-β-D-galactopyranoside-7-O-β-D-glucuropiranoside) is a derivative of quercetin and belongs to flavonoids, compounds commonly found in plants. Flavonoids have recently become the subject of numerous studies due to their different biological and pharmacological properties. *In vitro* and *in vivo* studies confirm their positive effect, both at the cell and the whole organism level. They exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anti-atherosclerotic, anti-allergic and other activities. Their anticancer activity is particularly important. One of the targets for flavonoids are cell membranes. At the same time, lensoside Aβ is a new compound isolated from the aerial parts of edible lentil (*Lens culinaris*) cultivar *Tina*. So far, there is very little data about secondary metabolites isolated from the leaves and stems of this plant.

The main aim of the doctoral thesis was to determine the ability of lensoside Aβ to interact with membranes (both with membrane lipids and proteins), to determine how this compound interacts with membranes, to investigate its localization and orientation in membranes, and to evaluate its effects on the cells. In order to explain how this flavonoid interacts with membranes and to confirm the influence of these interactions on normal and cancer cells, various research methods were applied such as: Fourier transform infrared absorption spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR), differential scanning calorimetry (DSC), confocal fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), patch clamp, transmission and scanning electron microscopy (TEM, SEM), light microscopy, fluorescence microscopy and flow cytometry. In the experiments multilayer vesicles (MLV), giant unilamellar vesicles (GUV) made of dipalmitoylphosphatidylocholine (DPPC) and *in vitro* cell cultures: cervical cancer (HeLa), laryngeal cancer (Hep-2) lines and human skin fibroblast line (HSF) were used.

The studies have shown that lensoside Aβ significantly affects on model membranes formed with DPPC. The tested compound incorporates into membranes and binds to the lipid polar head groups by hydrogen bonds between the C – O – P – O – C segment and hydroxyl groups of flavonoid.

Moreover, ^{1}H NMR and DSC analysis showed that the tested flavonoid has ordering effect on DPPC membranes and changes their physical properties. A slight decrease of the main phase transition temperature, the disappearance of the pretransition and a decrease in the calorimetric enthalpy and the co-operativity of the transition were found. FLIM investigation has revealed roughly parallel orientation of the examined compound with respect to the membrane. To determine the modulating effect of tested flavonoid on membrane transport proteins, patch-clamp technique was used. Lensoside Aβ has changed the activity of potassium channels in human skin fibroblasts, which resulted in their increased opening.

FTIR analysis confirmed that the tested compound, interacts with both proteins and lipids of the cells at the molecular level. The studied flavonoid interacts with the cell lipids in the region of the choline heads of phospholipids in HeLa and Hep-2 cells via the formation of hydrogen bonds with the – PO_2^- groups and the C-O-P-O-C segment. The lensoside Aβ clearly affects the spectral profile of proteins from the amide I spectral zone, which was manifested by changes in their secondary structure and reduction in their amount. On the other hand, it acts differently on normal cells of the HSF line by inducing the production of additional proteins and a slight ordering effect of the lipid fraction of the polar head groups region.

Results obtained by the neutral red and the LIVE/DEAD tests have revealed a cell line - dependent reduction in cell viability. Lensoside Aβ has been shown to have little effect on cell survival. It has the greatest effect on human cervical cancer cells. Its cytotoxic effect is correlated with the induction of apoptosis in HeLa and Hep-2 cancer cells whereas human skin fibroblasts are not sensitive to the cytotoxic effect of the tested flavonoid.

Cell analyses with application of transmission and scanning electron microscopy as well as light and fluorescence microscopy have shown the effects of lensoside Aβ on cancer cells. Changes in their shape, surface, morphometric parameters and ultrastructure were observed. Cells had features characteristic of apoptotic cells, such as: shrinkage of cells and nuclei, reduction or loss of microvilli, fragmentation of chromatin, strong vacuolation of cytoplasm, presence of autolysosomes, presence of membrane connections and the appearance of apoptotic bodies. At the same time, lensoside Aβ did not change the morphology and ultrastructure of normal human skin fibroblast cells.

The final stage of the research involved determining the effect of LAβ on the induction of oxidative stress in the cells. Studies have shown a dualistic mode of action of the tested compound. The flavonoid has induced oxidative stress in HeLa and Hep-2 cells and at the same time showed an antioxidant effect on normal human skin cells.

In conclusion, the results included in this dissertation, confirmed the influence of lensoside Aβ on cell membranes. By interacting with proteins and lipids of the cells, including the membrane lipids, the flavonoid changes their dynamic and structural properties. As a result, of this interaction, changes in a morphology and ultrastructure of cancer cells, which is mostly consistent with the apoptotic cell phenotype, are being observed. Simultaneously, the examined compound does not induce apoptosis in normal cells, does not also exhibit cytotoxic activity against them and enhances their protein synthesis. Such properties of lensoside Aβ make it a potential therapeutic agent, used alone or in combined therapy.

Key words:

flavonoids, liposomes, cancer cells, electron microscopy, FTIR

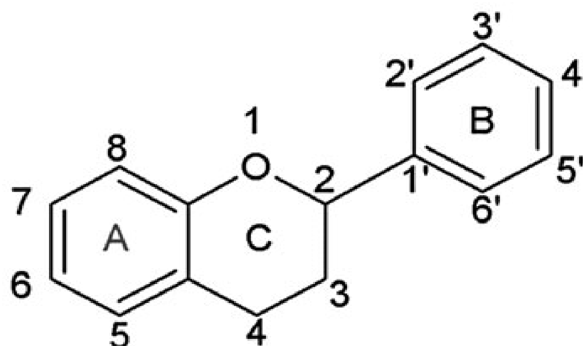
I. Wstęp

Rośliny od dawien dawna były wykorzystywane przez człowieka nie tylko jako źródło pokarmu ale również w celach leczniczych. Fitoterpapia czyli leczenie za pomocą roślin i substancji pochodzenia roślinnego była stosowana już ponad cztery tysiące lat temu przez Sumerów i Chińczyków, a jej rozkwit nastąpił w Egipcie. Już w czasach starożytnych, za sprawą Hipokratesa, Dioskurydesa oraz Galena znano około tysiąca gatunków roślin o działaniu leczniczym, z których otrzymywano napary, ekstrakty oraz inne postaci leków [Wieczorek i in., 2006]. W latach trzydziestych XX wieku, po otrzymaniu pierwszego syntetycznego chemioterapeutyku, nastąpił szybki rozwój chemii i produkcja leków syntetycznych. Syntetyki charakteryzujące się szybkim i silnym działaniem zastąpiły naturalne leki roślinne i stały się powszechnie stosowane. Niestety mimo silnego działania terapeutycznego, odkryto również niepożądane działanie środków syntetycznych. Zauważono, że takie substancje mogą powodować wymioty, biegunkę, nudności, wysypki a także działać hepatotoksycznie i nefrotoksycznie, jak również zaburzać funkcjonowanie układu krwionośnego. W dzisiejszych czasach, ze względu na bezpieczniejsze i łagodniejsze działanie naturalnych substancji roślinnych oraz ich niską toksyczność zaczęto powracać do ich stosowania, a rośliny oraz surowce z nich otrzymane stały się obiektem zainteresowań wielu badaczy [Drozd, 2012].

Substancje czynne występujące w roślinach leczniczych możemy podzielić na dwie grupy: produkty metabolizmu pierwotnego (metabolity pierwotne) i produkty metabolizmu wtórnego. Metabolity wtórne są niskocząsteczkowymi związkami, pełniącymi u roślin funkcje ochronne i sygnałowe [Sadowska i in., 2014]. Są syntetyzowane tylko w niektórych komórkach, tkankach czy organach. Gromadzą się przede wszystkim w wakuolach, przestrzeniach międzykomórkowych i na powierzchni tkanek [Kączkowski, 1993]. Podzielić je można na trzy podstawowe grupy: terpenoidy, niebiałkowe związki azotowe oraz związki fenolowe. Do tej ostatniej grupy należą flawonoidy, powszechnie występujące w roślinach [Jasiński i in., 2009]. Ze względu na swoje szerokie działanie farmakologiczne określane są jako witamina P [Czeczot, 2000]. Zarówno badania *in vitro* jak i *in vivo* potwierdzają ich działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwmiażdżycowe, detoksykujące i inne [Czeczot, 2000; Martinez-Florez i in., 2002]. Dzięki swojej aktywności biologicznej mogą mieć zastosowanie jako naturalne leki w terapii wielu chorób, w tym chorób nowotworowych.

1.1. Budowa chemiczna i podział flawonoidów

Flawonoidy są powszechnie występującymi pochodnymi 2-fenylo-benzo-γ-pironu. W swojej strukturze zawierają 15-atomowy szkielet węglowy oparty na układzie flawanu (C_6-C_3-C_6), który tworzą dwa pierścienie benzenowe (A i B) połączone heterocyklicznym pierścieniem piranu lub pironu (C) [Majewska i Czeczot, 2009] (Ryc.1).



Ryc. 1. Wzór podstawowego szkieletu węglowego flawonoidów [Bravo, 1998].

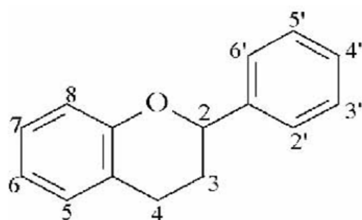
Naturalnie występujące związki flawonoidowe mają w swojej strukturze 3 grupy hydroksylowe: dwie w pierścieniu A w pozycji 5 i 7 oraz jedną w pozycji 3 pierścienia B. Związki te mogą różnić się obecnością podstawników, które powstają w wyniku hydroksylacji, metylacji, acetylacji i glikozydacji w różnych pozycjach pierścieni [Heim i in, 2002]. Obecność oraz różne położenie podstawników w pierścieniach wpływa na odmienne właściwości chemiczne i fizyczne tych związków, co przekłada się na indywidualny metabolizm danego związku oraz jego aktywność. I tak, antyoksydacyjne działanie flawonoidów związane jest z liczbą i położeniem grup hydroksylowych. Im większa ilość tych grup w cząsteczce związku tym silniejsze jego działanie przeciwutleniające [Rice-Evans i in., 1996].

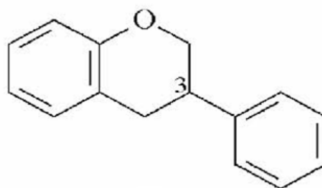
Flawonoidy w roślinach mogą występować w formie wolnej czyli aglikonów lub w postaci glikozydów czyli w połączeniu z cukrami. Cząsteczki cukrowe są przyłączane najczęściej w pozycji C-3, rzadziej w C-4’,C-3’, C-5 czy C-7. W formie glikozydów najczęściej występują flawony oraz flawonole. Dołączenie cząsteczek węglowodanów do aglikonu flawonoidów zwiększa ich polarność i rozpuszczalność, co istotnie wpływa na ich magazynowanie w wakuolach. Najczęściej przyłączanymi cukrami są: glukoza, galaktoza,

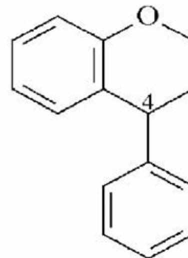
ramnoza czy ksyloza. Rzadziej występującymi podstawnikami glikozydowymi są mannoza, fruktoza, kwas glukuronowy i kwas galakturonowy [Majewska i Czeczot, 2009]. Ponadto flawonoidy mogą tworzyć pomiędzy sobą połączenia w postaci biflawonoidów lub występować jako oligo- i polimery (taniny) [Heim i in., 2002].

Związki flawonoidowe są klasyfikowane na podstawie różnic w budowie. Podział według Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. International Union of Pure and Applied Chemistry) opiera się na różnicach w pozycji przyłączenia pierścienia aromatycznego (pierścień B) do cząsteczki benzopiranu i wyróżnia trzy klasy (Ryc.2.):

- flawonoidy (pochodne 2-fenylobenzopiranu), w których pierścień B przyłączony jest w pozycji 2
- izoflawonoidy (pochodne3-fenylobenzopiranu), w których pierścień B przyłączony jest w pozycji 3
- neoflawonoidy (pochodne3-fenylobenzopiranu), w których pierścień B przyłączony jest w pozycji 4 [Moss i in., 1995].



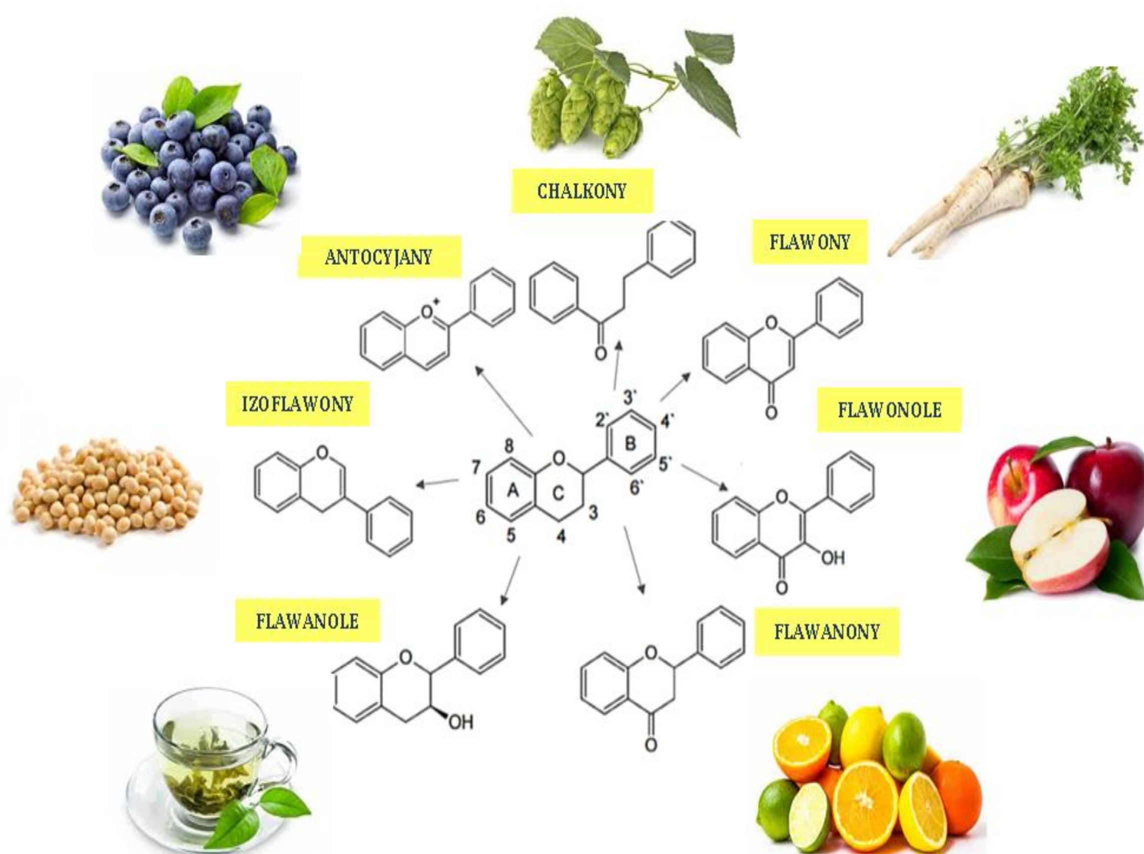




Ryc. 2. Główne klasy związków flawonoidowych wg IUPAC [Grotewold i in., 2006].

Klasy te są biogenetycznie i strukturalnie powiązane a ich wspólnym prekursorem jest chalkon. Na podstawie stopnia utlenienia oraz nasycenia pierścienia C, w obrębie klasy flawonoidów możemy wyróżnić następujące podklasy: flawony, flawonole, flawanony, flawon-3-ole lub katechiny i antocyjanidyny. Związki w obrębie podklas różnią się przede wszystkim obecnością różnych podstawników w pierścieniach A i B [Grotewold i in., 2006]. Do związków flawonoidowych zalicza się też związki, które swą budową odbiegają od

pierwotnej struktury charakterystycznej dla tej grupy. Do nich należą chalkony, które mają otwarty pierścień C, jak również aurony i auronole, których budowa oparta jest na układzie benzofuranu [Syam i in., 2012; Detsi i in., 2009]. Wzory poszczególnych klas i podklas flawonoidów zostały przedstawione na rycinie 3.



Ryc. 3. Najważniejsze klasy i podklasy flawonoidów [Golonko i in., 2015 w modyfikacji własnej]

1.2. Występowanie

Flawonoidy są związkami powszechnie występującymi w roślinach. Charakteryzuje je duża różnorodność. Stanowią trzecią, co do wielkości, grupę związków naturalnych po alkaloidach (12 000) i terpenoidach (30 000). Obecnie zidentyfikowano około 10 000 struktur flawonoidowych różniących się budową i wykazujących różne aktywności biologiczne [Małolepsza i Urbanek, 2000]. Dystrybucja flawonoidów w roślinach zależy od kilku czynników, m.in. od zmienności i stopnia ekspozycji na światło. Ich naturalnym źródłem są rośliny zarodnikowe, naczyniowe jak również mszaki i glony. Szczególnie

bogate we flawonoidy są rośliny z rodziny *Apiaceae, Asteraceae, Betulaceae, Brassicaceae, Ericaceae, Fabaceae, Hypericeae, Lamiaceae, Polygonaceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Scrophulariaceae* [Małolepsza i Urbanek, 2000]. Związki te obecne są we wszystkich częściach roślin, najwięcej jest ich w liściach i kwiatostanach, nieco mniej w owocach, korze, drewnie, korzeniach czy nasionach. Gromadzą się głównie w tkankach zdolnych do fotosyntezy, np. w miękiszu palisadowym i gąbczastym czy epidermie [Agati i in., 2013]. W komórkach roślin często występują w postaci glikozydów rozpuszczonych w soku wakuolarnym. Niektóre z nich ulegają krystalizacji w komórkach epidermy np. hesperydyna w owocach pomarańczy czy pochodne akacetyny we włoskach okrywających dziewanny [Małolepsza i Urbanek, 2000].

Głównym źródłem flawonoidów są przede wszystkim owoce oraz warzywa. Szczególnie bogate w związki polifenolowe, w tym flawonoidy są takie owoce jak: czarny bez, aronia, czarna porzeczka, borówka amerykańska, jagoda, jeżyna, jabłka oraz wiśnia. Wśród warzyw, najwyższą ilość flawonoidów zawierają: strąki fasoli, czarna oliwka, czerwona cebula, szpinak i szalotka [Rodriguez-Garcia i in., 2019]. Ponadto, występują w zbożach (jęczmień, gryka czy pszenica), nasionach (głównie roślin strączkowych) i przyprawach [Rienks i in., 2017; Steadman i in., 2001]. Można je znaleźć również w sokach owocowych, zwłaszcza w soku jabłkowym, soku pomarańczowym, soku grejpfrutowym i soku z cytryny [Guo i in., 2013]. Ich obecność stwierdzono również w czerwonym winie, czarnej herbacie oraz zielonej herbacie [Kokhar i Magnusdottir, 2002; Jandera i in., 2005]. Bogatym źródłem flawonoidów są kakao oraz jego produkty, takie jak ciemna i mleczna czekolada [Tomas-Barberan i in., 2007; Miller i in., 2006]. Występowanie głównych podklas flawonoidów w diecie przedstawia tabela 1.

Tab. 1. Występowanie poszczególnych podklas flawonoidów w diecie [Karak, 2009]

Podklasa związków flawonoidowych	Przykład związku	Występowanie w diecie
Flawonole	kwercetyna, kemferol, moryna, mirycetyna	cebula, brokuły, jarmuż, jabłka, wino z winogron, wiśnie
Flawony	apigenina, luteolina	pietruszka, seler, tymianek, czerwony pieprz
Flawanony	hespertyna, hesperdyna, naryngenina	owoce cytrusowe: pomarańcze, grejpfruty, cytryny
Izoflawony	genisteina, daidzeina	rośliny strączkowe (soja i jej produkty)
Flawon-3-ole	katechina, epikatechina, epigalokatechina	zielona herbata, jabłka, czerwone wino, czekolada
Antocyjany	cyjanidyna, pelargonidyna	jagody, jeżyny, wiśnie, truskawki, czarne porzeczki

Spożycie tych związków zależy od nawyków żywieniowych oraz ich zawartości w produktach spożywczych. Ponadto, na ilość przyjmowanych flawonoidów wpływają takie czynniki jak: położenie geograficzne, praktyki rolnicze, stres klimatyczny oraz czynniki kulturowe [Nielsen i in., 2003]. Na podstawie danych literaturowych stwierdzono, że dzienna ilość flawonoidów dostarczanych w diecie w społeczeństwach zachodnich wynosi 50-800 mg, natomiast w społeczeństwach wschodnich może wynosić do 2 g [Wiczkowski i Piskuła, 2004; Hollman i Katan, 1999].

1.3. Rola flawonoidów w roślinach

Flawonoidy działając jako cząsteczki sygnałowe i ochronne odgrywają kluczową rolę w rozwoju i wzroście roślin. Nadają roślinom różne barwy dzięki czemu wabią zwierzęta do zapylenia i rozsiewania nasion. Flawonole, flawony, chalkony i aurony odpowiadają za żółte zabarwienie, natomiast antocyjany warunkują ubarwienie czerwone, niebieskie i fioletowe. Oprócz tego determinują zapach, jak również smak owoców i kwiatów, dzięki czemu rośliny są rozpoznawane przez zwierzęta przenoszące pyłek czy nasiona [Jasiński i in., 2009]. Katechiny i procyjanidyny warunkują cierpki smak jabłek oraz herbaty. Z kolei naryngenina i florydzyna odpowiadają za gorzki smak grejpfrutów [Mitek i Gasik, 2009].

Związki te chronią rośliny przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Warunkują ich odporność na suszę oraz pomagają w aklimatyzacji do różnych warunków temperaturowych. Wykazano, że poziom tych związków wzrasta w odpowiedzi na różne czynniki, m.in. silnie nasłonecznienie, promieniowanie UV, niską/wysoką temperaturę, metale ciężkie czy suszę [Mierziak i in., 2014]. Flawonoidy lokalizując się w komórkach epidermy i hipodermy liści i łodyg oraz w merystemach wierzchołkowych działają jako filtry promieniowania UV pełniąc istotną rolę w ochronie tkanek roślinnych przed uszkodzeniem. Takie właściwości wynikają z obecności w ich cząsteczce układów chromoforowych czyli pierścienia aromatycznego i sprzężonych wiązań podwójnych. Ponadto, zdolność związków flawonoidowych do absorpcji promieniowania UV związana jest z liczbą grup hydroksylowych w ich cząsteczce [Li i in., 1993; Ryan i in., 2002; Warren i in., 2002].

Związki flawonoidowe pełnią rolę regulatorów wzrostu. Modyfikują działanie enzymów biorących udział w szlakach sygnałowych, prekursorów oraz inhibitorów enzymatycznych. Regulują poziom kwasu indolilo-3-octowego (IAA) w komórkach. Mono- i dihydroksylowe formy flawonoidów są inhibitorami transportu IAA przez błony komórkowe. Niektóre z nich, takie jak kwercetyna, apigenina czy kemferol wpływają na transport auksyn [Jacobs i Rubery, 1988; Małolepsza i Urbanek, 2000].

Flawonoidy odgrywają istotną rolę w oddziaływaniu roślin ze środowiskiem zewnętrznym. Pełnią funkcję repelentów, odstraszając owady oraz roślinożerców. Takie właściwości wykazują taniny występujące w liściach roślin drzewiastych [Golonko i in., 2015]. Niektóre flawonoidy mogą działać odstraszająco na nicienie glebowe, które żywią się roślinami. Kemferol, kwercetyna i mirycetyna (flawonole) odstraszają *Radopholus*

similis i *Meloidogyne incognita*, podczas gdy genisteina i daidzeina (izoflawony) chronią przed atakiem *Radopholus similis* [Wuyts i in., 2006]. Ponadto, działają jako fitoaleksyny czyli substancje obronne powstające na skutek kontaktu rośliny z czynnikiem patogennym. Związki flawonoidowe są toksyczne wobec patogennych grzybów i bakterii dzięki czemu chronią rośliny przed różnymi infekcjami [Jasiński i in., 2009]. Działanie przeciwgrzybiczne flawonoidów, szczególnie izoflawonoidów opiera się na hamowaniu rozwoju spor, wzrostu grzybni oraz uszkadzaniu struktury błony komórkowej grzyba [Beckman i in., 2000]. Z kolei ich działanie przeciwbakteryjne jest związane z inaktywacją białek transportujących otoczki komórkowej oraz białek odpowiadających za adhezję [Plaper i in., 2003; Naoumkina i in., 2010]. Flawonoidy rozpuszczalne w tłuszczach zmieniają płynność błon bakterii. Ponadto, są inhibitorami syntezy ich DNA i RNA [Mishra i in., 2009; Haraguchi i in., 1998; Wu i in., 2013]. Związki te, dzięki zdolności do hamowania wirusowych polimeraz oraz wiązania się z kwasami nukleinowymi lub białkami kapsydu wirusa, wykazują również aktywność przeciwwirusową [Selway, 1986].

Flawonoidy działają jako cząsteczki sygnałowe na wczesnym etapie symbiozy roślin strączkowych i bakterii *Rhizobium*. Niskie stężenie azotu stymuluje rośliny do syntezy flawonoidów, które z kolei działają jako atraktanty na bakterie azotowe. Naryngenina może stymulować kolonizację korzeni pszenicy przez *Azorhizobium caulinodans* [Webster i in., 1998]. Z kolei luteolina i chryzyna, wydzielane przez rośliny strączkowe, np. *Medicago sativa*, działają jako swoiste sygnały dla bakterii *Rhizobium* do zainicjowania symbiozy [Hartwig i in., 1990]. Związki flawonoidowe wydzielane przez korzenie roślin motylkowych indukują transkrypcję genów *nod*, które są odpowiedzialne za wytwarzanie i wysyłanie sygnałów pobudzających do tworzenia brodawek korzeniowych i wiązania azotu cząsteczkowego [Kneer i in., 1999; Makoi i Ndakidemi, 2012]. Niektóre z nich mogą zarówno indukować, jak i hamować ekspresję genów *nod* [Denarie i in., 1996; Cooper, 2004; Reddy i in., 2007]. Przykładem może być daidzeina i genisteina, które indukują geny *nod* u *Bradyrhizobium japonicum*, natomiast hamują ich ekspresję u *Sinorhizobium meliloti*. Tak specyficzne działanie pozwala bakteriom na rozróżnienie właściwych gospodarzy od innych gatunków roślin motylkowatych [Jones i in., 2007].

Związki flawonoidowe odgrywają również rolę w zjawisku mikoryzy czyli symbiozy pomiędzy korzeniami roślin a specyficznymi gatunkami grzybów. Mogą one mieć zarówno negatywny jak i pozytywny wpływ na ten proces [Nair in., 1991]. U *Trifolium repens* i *Medicago truncatula* stwierdzono podwyższoną zawartość flawonoidów [Ponce i in., 2004;

Schliemann i in., 2008]. Ponadto, kwercetyna, glikozydy kwercetyny oraz kemferol pozytywnie wpływają na wzrost strzępek i zarodników grzybów wchodzących w symbiozę z korzeniami lucerny [Tsai i Phillips, 1991].

Flawonoidy uczestniczą w zjawisku allelopatii czyli wzajemnych interakcjach między roślinami. Wydzielane przez liście i korzenie do środowiska zewnętrznego hamują kiełkowanie nasion i rozwój sadzonek [Małolepsza i Ubranek, 2000]. Przykładem mogą być flawony wydalane przez jęczmień hamujące kiełkowanie nasion chwastów [Kong i in., 2007].

Oprócz funkcji ochronnych zwiększają dostępność niektórych pierwiastków niezbędnych do wzrostu roślin. Gdy brakuje pokarmu są uwalniane do gleby, gdzie wiążą metale, np. żelazo. I tak, izoflawonoidy wydzielane przez korzenie *Medicago sativa L.* zwiększają dostępność jonów żelaza i anionów fosforanowych [Mierziak i in., 2014].

1.4. Biologiczna aktywność flawonoidów

Flawonoidy są związkami wykazującymi szeroki zakres biologicznych działań. Posiadają one właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, immunomodulacyjne, antymikrobiologiczne i przeciwalergiczne. Jest to związane z ich strukturą chemiczną oraz obecnością licznych podstawników w cząsteczkach.

1.4.1. Właściwości antyoksydacyjne

Reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) są wysoko reaktywnymi pochodnymi tlenu cząsteczkowego. Należą do nich anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy, nadtlenek wodoru oraz tlen singletowy. Związki te w dużych ilościach prowadzą do uszkodzenia komórek i w konsekwencji przyczyniają się do rozwoju wielu chorób takich jak: miażdżyca, cukrzyca, obniżenie odporności czy choroby nowotworowe [Hanasaki i in., 1994]. Aby zapobiec negatywnym skutkom działania ROS stosuje się związki o charakterze antyoksydacyjnym. Przeciwutleniacze działają w małych ilościach i są zdolne do zapobiegania utlenianiu związków łatwo utleniających się przez co chronią organelle komórkowe przed uszkodzeniami. Do przeciwutleniaczy zaliczamy również flawonoidy. Ich działanie ochronne oparte jest na różnych mechanizmach takich jak:

1) Bezpośrednie wychwytywanie wolnych rodników oraz reaktywnych form tlenu (ROS),
2) Aktywacja enzymów przeciwutleniających,
3) Chelatowanie jonów metali przejściowych,
4) Ograniczenie powstawania wolnych rodników oraz reaktywnych form tlenu poprzez hamowanie enzymów biorących udział w ich wytwarzaniu (oksydaza ksantynowa, błonowa oksydaza NADPH, mieloperoksydaza),
5) Ochrona niskocząsteczkowych antyoksydantów, takich jak askorbinian czy α-tokoferol przed utlenianiem [Prochazkova i in., 2011].

Działanie antyoksydacyjne tych związków w dużej mierze zależy od budowy chemicznej flawonoidów, szczególnie od liczby i położenia grup hydroksylowych. Wysoką aktywność przeciwutleniającą tych molekuł warunkuje obecność grup orto-3,4-dihydroksylowych w obrębie pierścienia B (grupy katecholowe, pirogalolowe). Ugrupowania te umożliwiają tworzenie wiązań wodorowych wewnątrz cząsteczki, co zwiększa stabilność rodników fenoksylowych. Im więcej grup hydroksylowych w pierścieniu B tym silniejsze działanie antyoksydacyjne [Małolepsza i Urbanek, 2000]. Również rozmieszczenie tych ugrupowań zwiększa te właściwości. Najmniejszą aktywność wykazują cząsteczki posiadające grupy hydroksylowe w pozycji meta, a najwyższą w pozycji orto. Nawet niewielkie zmiany w położeniu tych ugrupowań, ich glikozylacja lub metylacja, mogą osłabiać ich zdolność do wychwytywania i ograniczania powstawania wolnych rodników [Arora i in., 1998]. Działanie flawonoidów jako przeciwutleniaczy związane jest również z występowaniem grup hydroksylowych w pozycji meta 5,7 lub 3,5-didhydroksylowych w pierścieniu A. Obecność tych ugrupowań w cząsteczce apigeniny i kemferolu umożliwia hamowanie peroksydacji lipidów [Lemańska i in., 2001]. Istotnym czynnikiem związanym z antyoksydacyjnym działaniem flawonoidów jest jednoczesne występowanie podwójnego wiązania pomiędzy atomami C2 i C3 oraz grup 4-keto i 3 -hydroksylowych w pierścieniu C. Taki układ sprzyja przemieszczaniu elektronów [Rice-Evans i in., 1996]. Sugeruje się, że znaczny wpływ ma również przestrzenne ułożenie pierścienia B [Małolepsza i Urbanek, 2000]. Obecność grup hydroksylowych w pozycjach C3 i C3’ zwiększa zdolność do hamowania peroksydacji lipidów jak również ułatwia wychwytywanie anionorodnika ponadtlenkowego. Z kolei występowanie reszt cukrowych

w cząsteczce flawonoidów zmniejsza ich aktywność antyoksydacyjną, dlatego aglikony są lepszymi przeciwutleniaczami niż glikozydy [Rice-Evans i in, 1996].

Związki flawonoidowe mogą również działać bezpośrednio poprzez wychwytywanie wolnych rodników, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet -}$), rodnik hydroksylowy ($OH^{\bullet}$) czy tlenek azotu. Wynikiem tych reakcji jest tworzenie mniej reaktywnych rodników flawonoidowych, które mają zdolność do stabilizowania i przekazywania niesparowanych elektronów [Małolepsza i Urbanek, 2000; Pietta, 2000; Duthie i in., 2003].

Flawonoidy mają zdolność do indukcji enzymów detoksykujących fazy II takich jak: oksydoreduktaza chinonowa NAD(P), transferaza glutationowa czy transferaza UDP-glukuronozylowa), które chronią przed elektrofilowymi substancjami toksycznymi i stresem oksydacyjnym. Zwiększają aktywność enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa oraz katalaza [Middleton i in., 2000].

Flawonoidy mogą także chelatować jony metali przejściowych, przede wszystkim miedzi czy żelaza, które są katalizatorami reakcji prowadzących do powstawania rodnika hydroksylowego. Takie właściwości są związane z obecnością ugrupowań: 3'4'-dihydroksy w pierścieniu B, 4-keto, 3-hydroksy oraz 4-keto, 5-hydroksy w pierścieniu C cząsteczki flawonoidu. Za tworzenie kompleksów z jonami miedzi (Cu^{2+}) odpowiada grupa katecholowa w pierścieniu B [Arct i Pytkowska, 2008]. Flawonoidem wykazującym zdolność do chelatowania metali jest kwercetyna. Wiąże i stabilizuje jony żelaza [Ferrali i in., 1997. Ponadto, kwercetyna jak i moryna, tworzą kompleksy z kadmem (Cd II) [Kopacz i Kuźniar, 2003; Chlebda i in., 2010]. Flawonoidy dzięki zdolności do wiązania metali przejściowych, opóźniają procesy starzenia, zmniejszą stan zapalny oraz utrzymują prawidłowe ciśnienie krwi [Arct i Pytkowska, 2008].

Jednymi z głównych niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy są askorbinian obecny w cytozolu oraz α-tokoferol w błonie komórkowej i ludzkich lipoproteinach o niskiej gęstości (LDL). Liczne badania *in vitro* potwierdzają, że flawonoidy, poprzez chelatowanie metali przejściowych, istotnie zapobiegają utlenianiu askorbinianu. Jest to związane z obecnością grup hydroksylowych przy atomach węgla w pozycjach 3' i 4' pierścienia B oraz ugrupowań 3-hydroksy-4-karbonylowych [Ostrowska i Skrzydlewska, 2005].Ponadto kwercetyna i mirycetyna działają ochronnie na α-tokoferol [Zhu i in., 2000]. Podobne działanie wykazują wyciągi z zielonej herbaty zawierające epigalokatechinę, galusan epigalokatechiny,

epikatechinę oraz galusan epikatechiny, które stopniowo regenerują α-tokoferol w ludzkich lipoproteinach LDL [Zhu i in., 1999].

Innym mechanizmem antyoksydacyjnego działania flawonoidów jest obniżenie aktywności enzymów uczestniczących w enzymatycznej peroksydacji fosfolipidów, takich jak fosfolipaza A2, lipooksygenaza czy cyklooksygeneza [Middleton i in., 2000].

Niektóre flawonoidy mogą wykazywać działanie prooksydacyjne. Takie właściwości mają głównie związki, które w swojej strukturze posiadają 3 grupy hydroksylowe w pierścieniu B lub ugrupowanie katecholowe [Cao i in., 1997]. W zależności od dawki związku, typu komórki oraz warunków prowadzenia hodowli flawonoidy w komórkach mogą działać jako przeciwutleniacze lub utleniacze [Matsuo i in, 2005].

1.4.2. Właściwości przeciwzapalne i przeciwalergiczne

Przeciwzapalne działanie flawonoidów związane jest z hamowaniem enzymów regulatorowych oraz czynników transkrypcyjnych odgrywających kluczową rolę w kontroli mediatorów stanu zapalnego. Związki te są inhibitorami enzymów o działaniu prozapalnym, takich jak syntaza NO (iNOS), cyklooksygenaza-2 (COX-2) i lipooksygenaza (LOX) [Majewska i Czeczot, 2009]. Apigenina oraz kwercetyna zmniejszają poziom ekspresji COX-2 w komórkach indukowanych LPS natomiast luteolina obniża zarówno poziom COX-2 jak i iNOS. Niektóre flawonoidy takie jak mirycetyna, kempferol, kwercetyna i moryna hamują aktywność lipooksygenazy [Yao i in., 2004]. Celem działania związków flawonoidowych jest również czynnik jądrowy kappa B (NF-κβ), który reguluję ekspresję genów dla chemokin i cytokin prozapalnych oraz białek ostrej fazy. Ponadto, flawonoidy wpływają na komórki układu immunologicznego, przez co zmniejszają syntezę cytokin biorących udział w reakcjach zapalnych takich jak czynnik martwicy nowotworu (TNF-α), czy interleukiny 6 (IL-6) i 8 (IL-8). Katechina i kwercetyna działając synergistycznie hamują aktywność czynnika TNF-α i IL-1β. Z kolei genisteina zmniejsza poziom TNF-α, IL-6 i IL-1β w mysich makrofagach RAW indukowanych LPS-em [Noreen i in., 1998]. Związki flawonoidowe wykazują również aktywność przeciwalergiczną. Kwercetyna i luteolina hamują uwalnianie z mastocytów histaminy - mediatora odczynu alergicznego [Kimata i in., 2000]. Z kolei baikaleina blokuje wydzielanie eotaksyny, która powoduje napływ eozynofilii w kierunku ogniska reakcji alergicznej i zaostrzenie odpowiedzi zapalnej [Nakajima i in.,

2001]. Dobrym przykładem przeciwalergicznego działania flawonoidów jest hispidulina, wyizolowana z *Clerodendrum petasites* – rośliny stosowanej w leczeniu astmy. Związek ten rozluźnia mięśnie gładkie tchawicy [Hazekamp i in., 2001].

1.4.3. Właściwości antybakteryjne

Jednym z głównych globalnych problemów jest odporność na antybiotykoterapię dlatego istnieje potrzeba opracowywania nowych środków terapeutycznych [Cushnie i Lamb, 2011]. Bezpośrednia aktywność antybakteryjna flawonoidów jest związana z trzema głównymi mechanizmami działania. Po pierwsze związki te uszkadzają błony cytoplazmatyczne (poprzez perforację lub zmniejszenie płynności). Przykładem może być galangina powodująca znaczną utratę potasu w komórkach *Staphylococcus aureus*, co wskazuje na bezpośrednie uszkodzenie błony komórkowej. Kolejnym mechanizmem jest zahamowaniem syntezy kwasów nukleinowych (w wyniku inhibicji topoizomerazy) [Cushnie i Lamb, 2005]. Wykazano, że genisteina hamuje syntezę zarówno DNA jak i RNA w komórkach *Vibrio harveyi* [Ulanowska i in., 2006]. Ponadto, flawonoidy mogą hamować metabolizm bakterii. Ważnym aspektem działania przeciwbakteryjnego jest również ich wpływ na biofilmy bakteryjne, które wytwarzane przez bakterie chorobotwórcze odgrywają istotną rolę w patogenezie bakterii oraz oporności na antybiotyki [Winter i in, 1989; Li i in, 2012]. Wykazano, że flawonoidy hamują tworzenia biofilmu przez bakterie takie jak *Streptococcus mutans, Aeromonas shydrophila* i *Escherichia coli* [Lee i in, 2011]. Ponadto, naryngenina, kampferol i kwercetyna ograniczają tworzenie się biofilmu *E.coli*. Kolejnym mechanizmem jest tworzenie kompleksów z elementami ściany komórkowej bakterii, co w konsekwencji hamuje dalszą adhezję bakterii i ich wzrost. Kwercetyna i resweratrol w komórkach ludzkiej linii białaczki (U937) oraz monocytach zainfekowanych przez *Salmonella typhimurium* hamują namnażanie się bakterii oraz chronią je przez toksycznymi skutkami infekcji bakteryjnej [Paolillo i in., 2011].

1.4.4. Właściwości przeciwwirusowe flawonoidów

Flawonoidy zmniejszają zdolności zakaźne wielu wirusów ludzkich i zwierzęcych, w tym adenowirusów, HSV, HIV, wirusa zespołu rozrodczo-oddechowego świń,

retrowirusów, wirusa opryszczki, wirusa grypy, wirusa dengi, wirusa polio oraz rotawirusów. Takie działanie wykazują kwercetyna, apigenina, luteolina, epikatechina, epigalokatechina, rutyna, moryna czy kemferol. Stwierdzono, że flawonole mają silniejsze działanie wobec wirusa opryszczki pospolitej typu 1 i wirusa HIV niż flawony. Właściwości przeciwwirusowe tych związków związane są z ich działanie na wirusa, jak i komórki gospodarza. Flawonoidy modulują przyłączanie się wirusa do powierzchni komórki, wprowadzanie materiału genetycznego do komórek gospodarza, replikację, translację białek wirusa, tworzenie kompleksów glikoproteinowych otoczki białkowej wirusa i uwolnienie wirusa. Działają również na sygnalizację komórkową gospodarza, w tym na indukcję czynników biorących udział w transkrypcji genów oraz wydzielanie cytokin [Cushnie i Lamb, 2011]. Większość bioflawonoidów wpływa na replikację wirusa oraz hamuje tworzenie wirusowego DNA lub RNA. Baikalina jest inhibitorem replikacji wirusa natomiast apigenina i chryzyna hamują transkrypcję wirusową. Kwercetyna działa hamująco na wirusy RSV, wirus opryszczki (HSV-1) oraz wirus polio [Kaul i in., 1985]. Katechiny, taki jak EGCG oraz ECG są inhibitorami replikacji różnych podtypów wirusa grypy takich jak A/H1N1, A/H3N2 i B [Song i in., 2005]. Z kolei apigenina i luteolina wyizolowane z *Elsholtzia rugulosa* Hemsl., tradycyjnej chińskiej rośliny leczniczej, hamują aktywność neuraminidazy wirusa grypy (H3N2) [Liu i in., 2008]. Ponadto, baikalina i genisteina mogą blokować ludzki wirus cytomegalii, na różnych etapach zakażenia. Baikalina hamuje wnikanie wirusa do komórki gospodarza, natomiast genisteina produkcję wczesnych białek wirusa [Li i in., 2016]. Ponadto genisteina jest inhibitorem rozwoju wielu innych wirusów takich jak adenowirusy, HSV-1, HSV-2, HIV, SV40 czy rotawirusy [Li i in., 2000; Yura i in., 1993; Lyu i in., 2005; Dangoria i in., 1996; Andreas i in., 2009]. Flawonoidy mogą znaleźć zastosowanie w terapii AIDS. Jest to związane z ich zdolnością do hamowania aktywności odwrotnej transkryptazy. Inhibitorami tego enzymu są m.in. epikatechina, baikalina, kwercetyna i mirycetyna [Malińska i Kiersztan, 2004].

1.4.5. Właściwości przeciwgrzybicze flawonoidów

Flawonoidy są inhibitorami kiełkowania patogennych zarodników na roślinach oraz mają zdolność do zwalczania infekcji grzybiczych u ludzi. Liczne badania potwierdzają ich działanie przeciwgrzybicze wobec *Candida* spp., *Aspergillu*s spp., *Geotrichum* spp.,

Cladosporium spp., *Penicillium* spp., *Deuterophoma* spp., *Trichophyton* spp., *Dermatophyte* spp. i *Fusarium* spp [Al Aboody i Mickymaray, 2020]. Związki te hamują rozwój grzybów za pomocą różnych mechanizmów takich jak: rozrywanie błony komórkowej, dysfunkcjonowanie mitochondriów grzyba, hamowanie syntezy ściany komórkowej (poprzez inhibicję syntezy β-glukanów i chityny), hamowanie podziałów komórkowych czy syntezy RNA i białek [Al Aboddy i Mickymaray, 2020]. Działanie przeciwgrzybicze tych związków związane jest także z tworzeniem kompleksów z rozpuszczalnymi białkami obecnymi w ścianie komórkowej grzyba. Glabradyna, izoflawan wyizolowany z *Glycyrrhiza glabra* hamuje rozwój *Candida albicans, Candida tropicalis Candida neoformans* i *Candida glabratas* poprzez deformację ściany komórkowej oraz zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej [Liu i in., 2014]. Innym flawonoidem wykazującym działanie przeciwgrzybicze wobec *C. albicans* jest epigalokatechina, która blokuje rozwój strzępek tego grzyba oraz syntezę ergosterolu [Han, 2007]. Z kolei kwercetyna i naryngenina są inhibitorami wzrostu C. *albicans* i *S. cerevisiae* [Li i in., 2012].

1.5. Flawonoidy w profilaktyce i terapii chorób

Ze względu na szeroki zakres farmakologicznego działania, flawonoidy mogą być stosowane w profilaktyce i leczeniu stanów zapalnych oraz wielu chorób, m.in.: układu sercowo-naczyniowego czy cukrzycy. Jest to w dużej mierze związane z ich aktywnością antyoksydacyjną i przeciwzapalną. Szczególnie istotne jest ich działanie przeciwnowotworowe. Wykazano, że flawonoidy działają cytotoksycznie w stosunku do różnych komórek nowotworowych jednocześnie nie wpływając na komórki zdrowe [Sak, 2014]. Ponadto, niektóre flawonoidy takie jak katechiny mają właściwości neuroprotekcyjne i mogą zmniejszać występowanie choroby Parkinsona, choroby Alzheimera czy demencji [Horakova, 2011]. Z kolei izoflawony łagodzą objawy menopauzy i zapobiegają osteoporozie [Olszewska, 2003].

1.5.1. Właściwości przeciwnowotworowe

Liczne badania epidemiologiczne jak i kliniczne potwierdzają wpływ flawonoidów w zapobieganiu i leczeniu chorób nowotworowych. Związki te hamują powstawanie nowotworów jak również wpływają na rozrost już powstałych guzów oraz ich przerzuty [Malińska i Kiersztan, 2004]. W ostatnich latach intensywnie badano zastosowanie

flawonoidów oraz ich syntetycznych pochodnych w leczeniu raka jajnika, piersi, szyjki macicy, trzustki i prostaty [Batra i Sharma, 2013]. Niektóre z nich, takie jak kwercetyna, genisteina i flawopiridol weszły w kolejną fazę badań klinicznych [Ravishankar i in., 2013]. Związki te mogą hamować karcynogenezę na etapie inicjacji, promocji i progresji. Jest to związane nie tylko z ich właściwościami antyoksydacyjnymi, ale również z innym mechanizmami takimi jak inaktywacja czynników rakotwórczych, zatrzymanie cyklu komórkowego, indukcja apoptozy i różnicowania, zahamowanie proliferacji, angiogenezy oraz metastazy, a także wpływ na oporność wielolekową [Ren i in., 2003]. Na poziomie molekularnym związki te wpływają na kinazy białkowe (kinaza białkowa C, kinazy serynowo-tyrozynowe), receptory czynnika wzrostu naskórka (EGFR), receptory płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR), receptory czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGFR) czy kinazy zależne od cyklin (CDK), które odgrywają istotną rolę w rozwoju nowotworów [Singh i Agarwal, 2006].

Istotnym mechanizmem związanym z chemoprewencyjnym działaniem flawonoiodów, jest ich wpływ na enzymy metabolizujące fazy I (np. cytochrom P450), które odpowiadają zaś aktywację wielu prokarcynogenów do reaktywnych związków pośrednich. Flawonoidy mają zdolność do hamowania niektórych izozymów cytochromu P450 takich jak CYP1A1 czy CYP1A2 [Marchand i in., 2000; Tsyrlov i in., 1994]. Ponadto, są one odpowiedzialne za aktywację enzymów fazy II biotransformacji (transferaza glutationowa, reduktaza chinonowa, transferaza UDP-glukuronowa), które biorą udział w detoksykacji karcynogenów [Ren i in., 2003].

Jedną z cech charakterystycznych nowotworów jest nieograniczona proliferacja. Flawonoidy hamują namnażanie wielu linii komórkowych ludzkich nowotworów, jednocześnie nie wykazując działania toksycznego w stosunku do komórek prawidłowych. Jest to związane z blokowaniem replikacji DNA poprzez hamowanie enzymów zaangażowanych w ten proces. Przykładem mogą być acetyloglukopiranozydowe pochodne kwercetyny i kemferolu, które są inhibitorami polimerazy II DNA [Mizushina i in., 2003]. Z kolei luteolina hamuje aktywność topoizomerazy I [Chowdhury i in., 2002] a baikaleina, kwercetyna, mirycetyna, EGCG oraz ECG blokują działanie topoizomerazy II [Austin in., 1992]. Innym mechanizmem odpowiedzialnym za antyproliferacyjne właściwości flawonoidów jest ich zdolność do zatrzymywania cyklu komórkowego w jego punktach kontrolnych G1/S oraz G2/M. Związki polifenolowe mogą w sposób bezpośredni lub pośredni hamować kinazy zależne od cyklin (CDK), które są regulatorami cyklu

komórkowego, aktywacji komórek układu odpornościowego, neoangiogenezy oraz stanu zapalnego. Bezpośrednim inhibitorem CDK jest flawopirydol, który blokuje miejsce wiązania ATP [De Azevedo i in., 1996]. Większość flawonoidów działa jednak w sposób pośredni, poprzez stymulację transkrypcji białka p21 będącego inhibitorem CDK-2 i CDK-4. Niektóre z nich działają ochronnie na białko p53 i w ten sposób mogą hamować rozwój niektórych nowotworów. Ponadto, działanie antyproliferacyjne flawonoidów jest związane z blokowaniem niektórych enzymów biorących udział w regulacji proliferacji komórek, takich jak białkowa kinaza tyrozynowa (PTK), białkowa kinaza C (PKC) czy kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PIP3) czy dekarboksylaza ornitynowa. Wykazano, że apigenina i sylimarina hamują proces nowotworzenia u myszy poprzez inaktywację dekarboksylazy ornitynowej [Agarwal i in., 1994; Wei i in., 1990]. Związki flawonoidowe obniżają aktywność czynników transkrypcyjnych takich jak NF-κβ i AP-1, które pełnią ważną rolę w procesie nowotworzenia. Oprócz tego te kompleksy białkowe zaangażowane są w proces angiogenezy [Dębiński i in., 2001].

Znaczący wpływ na właściwości przeciwnowotworowe tych związków ma ich zdolność do indukcji apoptozy, zarówno szlaku wewnętrznego jak i zewnętrznego [Sakagami i in., 2000; Yin i in., 1999; Wenzel i in., 2000; Kuntz i in., 1999; Iwashita i in., 2000]. Flawonoidy mogą kierować komórki rakowe na drogę zaprogramowanej śmierci. Molekularne mechanizmy takiego działania nie zostały jeszcze do końca wyjaśnione [Ren i in., 2003]. Indukcja apoptozy przez flawonoidy jest najprawdopodobniej związana z hamowaniem aktywności tropoizomeraz DNA I i II [Wang i in., 1999; Bailly, 2000, Sukardiman-Darwanto i in., 2000], obniżaniem ilości reaktywnych form tlenu [Lee i in., 2002], regulacją ekspresji białek szoku cieplnego (HSP) [Rong i in., 2000], modulacją szlaków sygnałowych [Yin in., 1999], uwalnianiem cytochromu c oraz aktywacją kaspazy 9 i 3, regulacją ekspresji białek Blc-2, Bcl-X, zwiększoną ekspresją białek Bax, Bak, jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa B (NF-κB) czy aktywacją endonukleaz [Wenzel i in., 2000; Iwashita i in., 2000; Lee i in., 2002; Konig i in., 1997].

Kolejnym istotnym mechanizmem jest hamowanie angiogenezy czyli powstawania nowych naczyń krwionośnych. Wszelkie zaburzenia tego procesu mogą powodować niekontrolowany wzrost i przerzuty [Fan i in., 1995]. Flawonoidy jako inhibitory angiogenezy niszczą podstawową strukturę naczyń krwionośnych guza, jak również zakłócają różne etapy tego procesu takie jak proliferacja i migracja komórek śródbłonka czy formowanie światła naczynia. W wyniku takiego działania substancje odżywcze oraz tlen

nie są dostarczane do szybko rosnących komórek rakowych, co prowadzi do spowolnienia ukrwienia guza, oraz jego rozrostu [Ren i in., 2003].

Innym celem działania flawonoidów są metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP). Są to proteolityczne enzymy, które pozwalają komórkom nowotworowym na niszczenie zewnątrzkomórkowej macierzy (ECM), penetrację błony podstawnej komórek i przemieszczanie się w inne rejony. Enzymy te również regulują adhezję komórkową, co ułatwia migrację nowotworu. Flawonoidy mogą zapobiegać przerzutom poprzez hamownie aktywności niektórych metaloproteinaz [Lefort i Blay, 2013; Makrilia i in., 2009]. Przykładowo fisetyna blokuje ekspresję MMP-1, MMP-9, MMP-7, MMP-3 i MMP-14 związanych z remodelowaniem macierzy zewnątrzkomórkowej w komórkach śródbłonka naczyniowego pępowiny (HUVEC) i w komórkach włókniakomięsaka HT-1080 [Park i in., 2013].

Jednym z niekorzystnych zjawisk jakie obserwuje się podczas chemioterapii jest zjawisko oporności wielolekowej. W przypadku wielu nowotworów dochodzi do nadekspresji glikoproteiny P oraz białka MRP, które powodują usuwanie cytostatyków z komórek czyniąc je opornymi na chemioterapeutyki [Badowska-Kozakiewicz, 2011]. Na podstawie wielu badań stwierdzono, że w liniach nowotworowych opornych na działanie chemioterapii, flawonoidy mogą powodować wzrost stężenia cytostatyków. Przykładem może być kwercetyna zwiększająca stężenie doksorubicyny w komórkach raka piersi czy genisteina powodująca wzrost stężenia cisplatyny [Lamson i Brignall, 1999]. Angelini i współpracownicy wykazali, że podobne działanie mają apigenina oraz fistyna, które zwiekszają stężenie doksorubicyny w badanych komórkach poprzez hamowanie aktywności glikoproteiny P [Angelini i in., 2010].

1.5.2. Wpływ flawonoidów na układ krwionośny

Choroby układu sercowo-naczyniowego są związane z odkładaniem się blaszek miażdżycowych w ścianach naczyń tętniczych, co prowadzi do zwężenia naczyń krwionośnych oraz wielu poważnych chorób takich jak choroba wieńcowa [Florkowska i in., 2017]. Flawonoidy wywierają korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy, obniżając ryzyko umieralności na choroby tego układu. Liczne badania wykazały odwrotną korelację pomiędzy spożyciem produktów zawierających duże ilości tych związków a

występowaniem chorób takich jak choroba wieńcowa czy udar mózgu. Ochronne działanie flawonoidów związane jest z ich aktywnością antyoksydacyjną i przeciwzapalną. Związki polifenolowe działając jako przeciwutleniacze hamują peroksydację lipidów błonowych oraz chronią lipoproteiny o małej gęstości (LDL) przed utlenieniem. Ponadto pozytywnie wpływają na gospodarkę lipidową organizmu, zwiększając poziom lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) jednocześnie zmniejszając poziom lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), triacylogliceroli i cholesterolu całkowitego we krwi. Flawonoidy poprawiają krążenie i regulują przepuszczalność naczyń dlatego są stosowane w leczeniu chorób zakrzepowo-zatorowych [Makowska-Wąs i Janeczko, 2004]. Związki te wzmacniają, uelastyczniają i uszczelniają ściany naczyń krwionośnych poprzez hamowanie aktywności hialuronidazy. Procyjanidyny wzmacniają ściany naczyń krwionośnych jak również czynnie zapobiegają zakrzepom i rozrostowi blaszki miażdżycowej w tętnicach. Ponadto, hamują agregacje płytek krwi, co zmniejsza krzepliwość krwi i zapobiega zakrzepicy żylnej, zawałom i udarom [Karłowicz-Bodalska i in, 2006].

Flawonoidy rozszerzają naczynia krwionośne, zmniejszając jednocześnie ciśnienie krwi. Przykładem jest kwercetyna, która chroni komórki śródbłonka naczyń i mięśni gładkich oraz obniża ciśnienie krwi [Marunaka i in., 2017]. Dobrze poznane jest też działanie rutyny na układ sercowo-naczyniowy. Związek ten ma właściwości antyoksydacyjne, przeciwpłytkowe, przeciwzakrzepowe, wazoprotekcyjne i kardioprotekcyjne. Jest stosowana *per se* lub w postaci preparatu złożonego w leczeniu przewlekłej niewydolności żylnej, wybroczynach krwawych, żylakach podudzia i obrzękach kończyn dolnych, a także hemoroidów [Samaszko-Fiertek i in., 2016; Ostrowska-Skrzydlewska, 2005; Guimaraes i in., 2015; Ekiert i in., 2014]. Hesperydyna, inny flawonoid występujący w skórce owoców cytrusowych zmniejsza przepuszczalność naczyń krwionośnych, zwiększa napięcie ścian żył oraz ogranicza agregację trombocytów [Fardid i in., 2016; Tarko i in., 2016]. Z kolei naryngenina, której głównym źródłem są pomarańcze i grejpfruty, zmniejsza niedokrwienie mięśnia sercowego oraz chroni przed kardiotoksycznością wywołaną leczeniem doksorubicyną [Zhang i in., 2015].

1.5.3. Właściwości przeciwcukrzycowe

Cukrzyca jest chorobą związaną z upośledzeniem syntezy i wydzielania insuliny lub/i niewrażliwością komórek docelowych na ten hormon. W rezultacie prowadzi do wysokiego poziomu glukozy we krwi. Na podstawie badań doświadczalnych wykazano, że niektóre flawonoidy mogą działać przeciwcukrzycowo. Jest to związane z kilkoma mechanizmami m.in. ze stymulacją syntezy i wydzielania insuliny, hamowaniem syntezy glukozy w hepatocytach czy spowalnianiem wchłaniania glukozy w jelicie [Malińska i Kiersztan, 2004]. Szczególnie silnie działanie przeciwcukrzycowe wykazują flawonoidy znajdujące się w zielonej herbacie takie jak epikatechina czy galusan epigalokatechiny. Zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* odnotowano, że epikatechina stymuluje syntezę insuliny w komórkach β trzustki. Inny mechanizm działania zaobserwowano w przypadku epigalokatechiny. W badaniach na szczurzych komórkach wątrobowych związek obniżał syntezę glukozy, jednocześnie powodując obniżenie aktywności kluczowych enzymów glukoneogenezy. Niektóre flawonoidy, takie jak luteolina, 7-O-glukozyd luteoliny oraz daidzeina hamują aktywność enzymów uczestniczących w hydrolizie węglowodanów w przewodzie pokarmowym takich jak α-amylazy oraz α-glukozydazy, przez co spowalniają wchłanianie glukozy [Kim i in., 2000]. Ader i współpracownicy ujawnili, że glikozydy kwercetyny osłabiają działanie występującego w enterocytach transportera glukozy SGLT-1, co zapobiega wzrostowi stężenia glukozy we krwi po posiłku [Ader i in., 2001]. Oprócz opisanych mechanizmów flawonoidy zapobiegają powikłaniom spowodowanym rozwojem choroby. Na przykład kwercetyna poprzez hamowanie aktywności reduktazy aldolowej spowalnia utratę wzroku u osób chorych na cukrzycę [Malińska i Kiersztan, 2004].

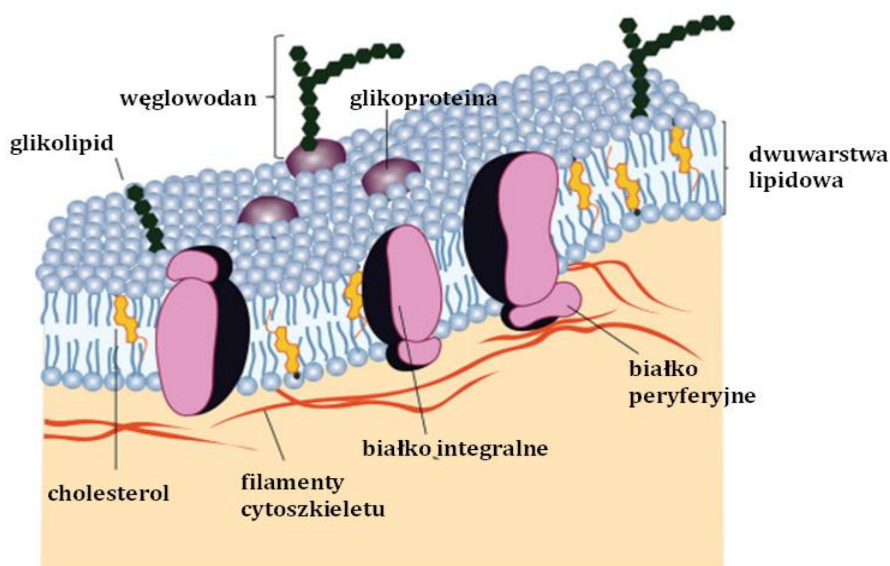
1.6. Błona biologiczna

Jednym z elementów strukturalnych i funkcjonalnych każdej komórki jest błona komórkowa. Jej podstawową funkcją jest zapewnienie integralności poprzez oddzielenie komórki od środowiska zewnętrznego. Dodatkowo w komórkach eukariotycznych odpowiada za ich kompartmentację co umożliwia zachodzenie jednocześnie różnych, często przeciwstawnych procesów. Oprócz tego membrana spełnia wiele ważnych funkcji, m.in. uczestniczy w biernym i czynnym transporcie jonów i innych substancji oraz bierze udział w pobieraniu cząsteczek do wnętrza komórki i usuwaniu zbędnych produktów na zewnątrz.

Ponadto błona komórkowa reaguje na sygnały pochodzące z zewnątrz oraz przenosi sygnały do innych obszarów komórki lub przekazują je do innych komórek. Bierze również udział w oddziaływaniu komórki z podłożem lub innymi komórkami [Kawiak, 1995].

Błony komórkowe mimo zróżnicowania strukturalnego i funkcjonalnego mają kilka cech wspólnych. Po pierwsze są to struktury warstwowe. Ich grubość waha się w granicach 6-10 nm. Głównymi składnikami błon są przede wszystkim lipidy oraz białka, jak również w mniejszym stopniu węglowodany, których zawartość nie przekracza zazwyczaj 10%. Związki te są głównie związane kowalencyjnie z lipidami (glikolipidy) lub białkami (glikoproteiny). Zarówno glikolipidy, jak i glikoproteiny odgrywają ważną rolę w rozpoznawaniu komórek. Zlokalizowane są na zewnętrznej monowarstwie lipidowej, od strony środowiska zewnętrznego [Stryer, 2003].

Cząsteczki lipidów tworzą w środowisku wodnym dwuwarstwę lipidową, która stanowi główną strukturę błony oraz tworzy barierę przepuszczalności. Za pozostałe funkcję błony odpowiadają białka błonowe, nadając jej określone właściwości. Białka błonowe są wbudowane w dwuwarstwę lipidową (białka integralne) bądź zakotwiczone na jej powierzchni (białka powierzchniowe) (Ryc.4). Mogą one pełnić funkcję kanałów, pomp, receptorów czy enzymów [Stryer, 2003].



Ryc. 4. Schematyczna budowa błony biologicznej [Monteiro, 2014].

1.6.1. Charakterystyka lipidów błonowych

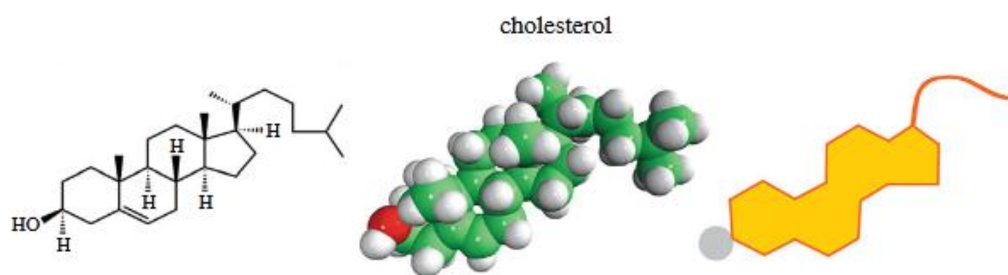
Lipidy są związkami organicznymi o zróżnicowanej budowie i składzie, charakteryzującymi się słabą rozpuszczalnością w wodzie i dobrą rozpuszczalnością w substancjach organicznych takich jak chloroform czy etanol. Jest to związane z obecnością w ich strukturze kwasów tłuszczowych zbudowanych z długich, nierozgałęzionych łańcuchów węglowodorowych, o parzystej liczbie atomów węgla (od 14 do 24). Łańcuchy alkilowe mogą być nasycone lub nienasycone i zawierać jedno lub kilka wiązań podwójnych [Stryer, 2003].

Lipidy stanowią główny składnik błony komórkowej. Ich zawartość może różnić się w zależności od rodzaju błony, od 20 % (membrany mitochondriów) do 80 % (osłonka mielinowa neuronów). Ze względu na amfipatyczny charakter cząsteczki te w obrębie dwuwarstwy lipidowej układają się w taki sposób, że części hydrofobowe (łańcuchy węglowodorowe) skierowane są do środka, natomiast części hydrofilowe (głowy polarne) na zewnątrz membrany. Skład lipidowy błon odpowiada za ich właściwości fizykochemiczne takie jak płynność, przepuszczalność, przemiany fazowe czy potencjał powierzchniowy i transbłonowy. Wpływa również na aktywność białek błonowych. Lipidy znajdujące się w błonach ssaków należą do trzech głównych klas: fosfolipidów, glikolipidów i steroli [Berg i in., 2011, Watson, 2015].

Główny składnik membran stanowią fosfolipidy. Składają się z rdzenia, przyłączonych do niego kwasów tłuszczowych, grupy fosforanowej oraz związanego z nią alkoholu. Kwasy tłuszczowe stanowią hydrofobową część cząsteczki, natomiast pozostałe elementy odpowiadają za jej hydrofilowy charakter i oddziaływanie z środowiskiem zewnętrznym. W zależności od rodzaju alkoholu stanowiącego rdzeń fosfolipidu dzieli się je na dwie główne klasy: glicerofosfolipidy i sfingolipidy. Przykładami glicerofosfolipidów są fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloetanolamina (PE), fosfatydyloseryna (PS), fosfatydyloinozytol (PI) oraz fosfatydyloglicerol (PG). Sfingolipidy są cząsteczkami, w których rdzeń stanowi długołańcuchowy, nienasycony aminoalkohol - sfingozyna. Najpowszechniejszym sfingolipidem jest sfingomielina obecna w osłonkach mielinowych włókien nerwowych. Fosfolipidy pełnią przede wszystkim funkcje strukturalne. Uczestniczą w tworzeniu bariery dla biernego przemieszczania się jonów oraz zapewniają specjalne środowisko dla funkcjonowania białek błonowych [Karp, 2019; Khan i in., 2013; Stryer, 2003; Watson, 2015].

Inną grupą lipidów błonowych są glikolipidy. Są to molekuły zawierające w swojej strukturze resztę cukrową. Glikolipidy są asymetrycznie rozmieszczone w błonie i lokalizują się tylko i wyłącznie po zewnątrzkomórkowej stronie błony komórkowej [Karp, 2019; Stryer, 2003].

Trzecią grupę związków budujących błonę stanowią sterole. Związki te mają budowę pierścieniową i występują w błonach komórek zwierząt, roślin i mikroorganizmów. Głównym sterolem obecnym w błonach komórek zwierzęcych jest cholesterol, z kolei u roślin występują stigmasterol i β-sitosterol. Cholesterol składa się z czterech pierścieni, do których z jednej strony przyłączona jest grupa hydroksylowa, natomiast z drugiej długołańcuchowy kwas tłuszczowy (Ryc.5). Związek ten wpływa na organizację i płynność błon biologicznych, a także wspólnie z fosfolipidami odpowiada za ich właściwości fizykochemiczne. Duża zawartość cholesterolu zmniejsza płynność błony, co powoduje stabilizację jej struktury [Karp, 2019; Khan i in., 2013; Stryer, 2003, Watson, 2015].



Ryc. 5. Budowa cząsteczki cholesterolu [Monteiro, 2014]

1.6.2. Białka błonowe

Mimo, że podstawową strukturę błon tworzy dwuwarstwa lipidowa, to jednak białka odpowiadają za jej specyficzne funkcje. Większość tych białek to przede wszystkim receptory, które pośredniczą w komunikacji komórki ze środowiskiem zewnętrznym, białka enzymatyczne - przenoszące sygnały wewnątrzkomórkowe, białka tworzące kanały i pompy - biorące udział w transporcie różnych substancji oraz białka wiążące filamenty aktynowe. Bez białek błonowych dwuwarstwa lipidowa stanowiłaby nieprzenikalną barierę i komórki nie byłyby w stanie komunikować się między sobą, transportować składniki odżywczych oraz produktów przemiany materii jak również reagować na bodźce zewnętrzne.

W zależności od rodzaju komórek oraz poszczególnych organelli błona komórkowa może zawierać setki różnych białek. Zawartość białek w błonie waha się od 20% dla błon mielinowych do 80% w przypadku wewnętrznej błony mitochondrialnej. Wśród białek błonowych możemy wyróżnić białka powierzchniowe, integralne i białka zakotwiczone przez lipidy (Ryc.6) [Karp, 2019; Khan i in., 2013; Stillwell, 2013].

1.6.2.1. Białka powierzchniowe

Są to rozpuszczalne w wodzie globularne białka, które są przyłączone do powierzchni błony za pomocą wiązań elektrostatycznych lub wodorowych. Nie wnikają w hydrofobowych rdzeń dwuwarstwy lipidowej ale mogą wykazywać słabe oddziaływania hydrofobowe. Dzieli się je na dwa typy: białka, które są przyłączone na powierzchni białek integralnych oraz białka przyłączone do głów polarnych fosfolipidów dwuwarstwy lipidowej. Mogą być łatwo usuwane z powierzchni błony przez zmienne pH lub siły jonowej [Hianik, 2006]. Przykładami białek powierzchniowych są cytochrom c (wiąże się z białkami integralnymi) oraz zasadowe białko mieliny (wiąże się z fosfolipidami) [Karp, 2019; Stillwell, 2013].

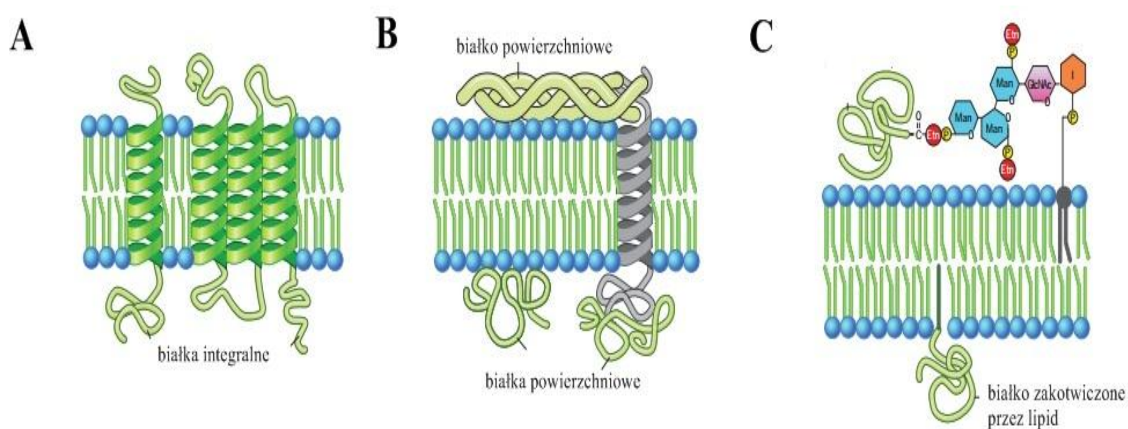
1.6.2.2. Białka integralne

Białka integralne stanowią 20-30 % wszystkich białek komórki. Są ściśle i trwale związane z błoną. Aby je wyizolować z membrany konieczne jest zniszczenie dwuwartswy lipidowej poprzez użycie rozpuszczalników organicznych lub detergentów (np. Triton X-100). Złożone są z części hydrofilowej, która kontaktuje się ze środowiskiem wodnym i części hydrofobowej zanurzonej w dwuwarstwie lipidowej. Transbłonowy fragment tych białek może mieć konformację α-helisy lub β-beczułki. Białka transbłonowe mogą przecinać dwuwarstwę lipidową raz i wtedy mówimy o białkach monotopowych, lub kilka razy (białka politopowe). Do białek monotopowych zaliczamy między innymi aminopeptydazę i izomaltazę. Przykładami białek politopowych są rodopsyna i bakteriorodopsyna [Hianik, 2006; Karp, 2019; Stillwell, 2013].

1.6.2.3. Białka zakotwiczone przez lipidy

Są to białka utrzymujące się na powierzchni błony za pomocą lipidowych elementów zakotwiczonych w błonie komórkowej. Elementy kotwiczące zostają przyłączone do białek w wyniku potranslacyjnej modyfikacji. Modyfikacje te obejmują między innymi

kowalencyjne przyłączanie długołańcuchowych grup acylowych, szczególnie mirystylanu, palmitynianu, przyłączanie cholesterolu lub C-końcowe zakotwiczenie białek przez glikozylofosfatydyloinozytol (GPI). Takie modyfikacje zmieniają hydrofobowy charakter białek, wpływają na ich strukturę oraz ułatwiają ich interakcję z błoną komórkową, a zatem mogą odgrywać istotną rolę w procesach sygnalizacji komórkowej, różnicowania i wzrostu, oraz wpływać na funkcjonowanie komórek (Karp, 2019; Stillwell, 2013).



Ryc. 6. Rodzaje białek błonowych [Karp, 2019].

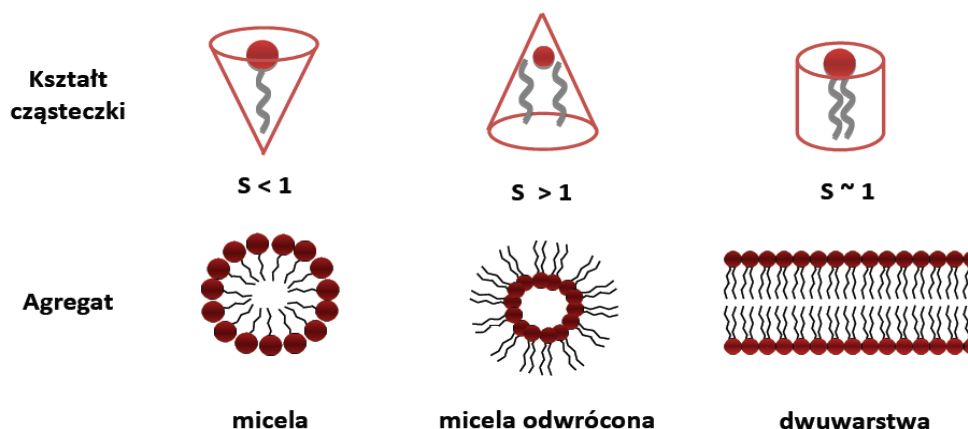
1.6.3. Asymetria błon komórkowych

Błony komórkowe są strukturami asymetrycznymi, zarówno pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym. Obserwuje się zróżnicowanie składu lipidowego, białkowego oraz węglowodanowego w poszczególnych monowarstwach błony [Berg i in., 2011]. Stopień asymetrii zależny jest od rodzaju błony i typu komórki. Jedynie błony retikulum endoplazmatycznego charakteryzują się symetrycznym rozmieszczeniem fosfolipidów podczas gdy w pozostałych błonach (aparat Golgiego, błony plazmatyczne i endosomalne) związki te są rozłożone niesymetrycznie [van Meer i in., 2008]. Wyraźną asymetrię obserwuje się w błonach erytrocytów [Devaoux i Zachowski, 1993]. Fosfolipidy zawierające w swojej strukturze cholinę czyli fosfatydylocholina oraz sfingomielina występują głównie w zewnętrznej monowarstwie lipidowej błony. Z kolei te zawierające grupę aminową, do których należą fosfatydyloseryna oraz fosfatydyloetanoloamina znajdują się po stronie cytozolowej dwuwarstwy. W konsekwencji wpływa to na bardziej ujemny ładunek wewnętrznej warstwy błony [Wood i in., 2011]. Mniejsze fosfolipidy takie jak

fosfatydyloinozytol przeważają w warstwie wewnętrznej a glikolipidy zawierające reszty cukrowe zlokalizowane są po zewnętrznej stronie błony [Devaux i Zachowski, 1993]. Jeśli chodzi o rozmieszczenie cholesterolu wyniki są sprzeczne. Dane otrzymane przez Fischera w 1976 wskazywały na wyższy poziom tego sterolu w warstwie zewnętrznej [Fisher, 1976]. Natomiast większość autorów uważa, że związek ten występuje równomiernie w obydwu warstwach błony [Muller i Herman, 2002]. Z kolei ostatnie badania na komórkach nabłonkowych pochodzących z jajnika chomika chińskiego (CHO) z zastosowaniem metod fluorescencyjnych sugerują większą zawartość cholesterolu (60-70 %) w warstwie cytolozolowej dwuwarstwy lipidowej [Mondal i in., 2009].

1.6.4. Agregacja związków amfifilowych

Lipidy ze względu na swoje właściwości amfifilowe mają zdolność do spontanicznej agregacji na granicy faz. W środowisku wodnym cząsteczki fosfolipidów tworzą uporządkowane struktury (Ryc. 7), co pozwala zminimalizować niekorzystne interakcje hydrofobowe pomiędzy cząsteczkami wody a niepolarnymi łańcuchami węglowodorowymi kwasów tłuszczowych. Za ten proces odpowiedzialne są oddziaływania hydrofobowe. Dodatkowo stabilizacja powstałych struktur wynika z oddziaływań van der Waalsa między łańcuchami węglowodorowymi oraz oddziaływań przez wiązania wodorowe i elektrostatyczne w regionie polarnym cząsteczki lipidu [Solomon i in., 2008; Stryer, 2003]. Rodzaj powstających struktur zależy przede wszystkim od kształtu molekularnego lipidu, tj. objętości i długości łańcucha acylowego oraz powierzchni części polarnej, jak również od rodzaju lipidu, temperatury czy pH środowiska. Cząsteczki których części polarne zajmują większy obszar niż łańcuchy kwasów tłuszczowych (pojedynczy łańcuch), ($S<1$) mają kształt odwróconego stożka i w środowisku wodnym formują micele. Do takich związków należą lizofosfolipidy oraz detergenty. Z kolei lipidy o kształcie stożka (np. fosfatydyloetanoloamina), w których region niepolarny zajmuje większą objętość niż region polarny ($S>1$) tworzą odwrócone micelle. Natomiast forma dwuwarstwy lipidowej jest charakterystyczna dla cząsteczek, w których część hydrofobowa i hydrofilowa zajmują podobne obszary ($S\sim1$). Przykładami cząsteczek tworzących formy dwuwarstwy lipidowej są fosfatydylocholina i sfingomielina [Tresset, 2009; Vance i Vance, 2008].

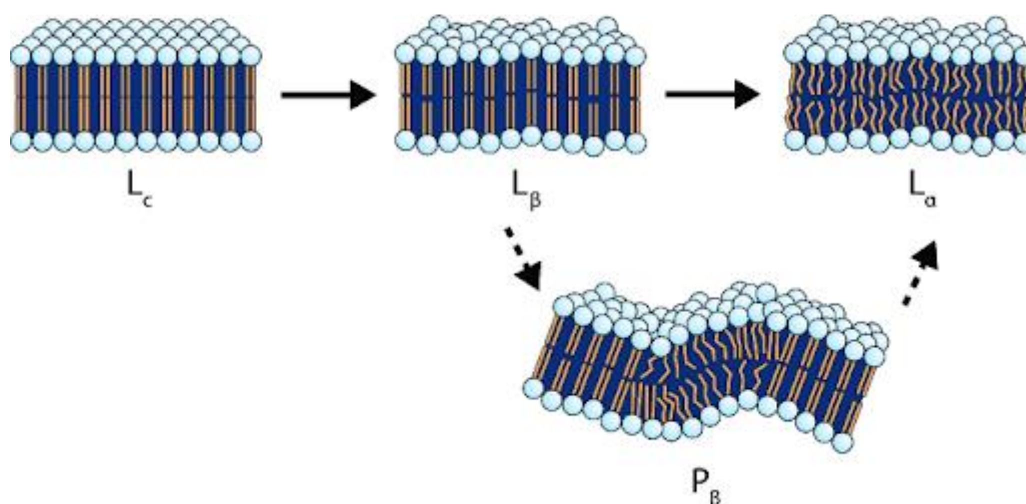


Ryc. 7. Zależność struktury agregatów lipidowych od kształtu cząsteczki lipidu [Litwińczuk-Mammadova i in., 2016].

1.6.5. Przemiany fazowe dwuwarstwy lipidowej

Lipidy obecne w dwuwarstwie lipidowej ulęgają przemianom fazowym wraz ze zmianami temperatury. Syntetyczna dwuwarstwa lipidowa, utworzona z jednego rodzaju fosfolipidu przechodzi ze stanu krystalicznego (żelu) do stanu ciekłokrystalicznego, w ściśle określonej temperaturze nazywanej temperaturą głównego przejścia fazowego (T_m). Tę zmianę stanu określamy jako przejście fazowe. Jest to proces kooperatywny i ma znaczący wpływ na właściwości dwuwarstwy lipidowej. Temperatura przejścia fazowego jest charakterystyczna dla poszczególnych rodzajów lipidów i zależy od cech ich budowy. Wydłużenie łańcuchów węglowodorowych powoduje podwyższenie temperatury przejścia fazowego. Innymi czynnikami determinującymi Tm są stopień nasycenia łańcuchów kwasów tłuszczowych, stopień hydratacji dwuwarstwy, kwasowość, obecność jonów, cukrów czy cholesterolu [Litwińczuk-Mammadova i in., 2016]. Uwodniona dwuwarstwa lipidowa uformowana z DPPC przy zmianie temperatury z 18 do 42°C, przechodzi przez trzy przejścia fazowe (Ryc. 8). Podczas jej ogrzewania wzrasta ruch cząsteczek oraz uwodnienia. Jest to związane między innymi z osłabieniem wiązań van der Waalsa i wiązań elektrostatycznych [Chapman, 1975]. W niższych temperaturach błona uformowana z DPPC znajduje się w fazie krystalicznej oznaczanej symbolem Lc (ang. *lamellar crystaline phase*) [Tardieu i in., 1973]. Cechą charakterystyczną tej fazy jest uporządkowanie oraz wydłużone i usztywnione łańcuchy węglowodorowe. Głowy polarne lipidów są ciasno ułożone co ogranicza ich ruch i uniemożliwia wnikanie cząsteczek wody w głąb dwuwarstwy [Lewis i McElhaney, 2005]. Gdy temperatura wzrasta dochodzi do przemiany z fazy krystalicznej do

fazy żelowej (ang. *lamellar gel phase*, Lβ) w wyniku spadku uporządkowania cząsteczek lipidowych [Koynova, 1998]. Kolejny wzrost temperatury powoduje wzrost hydratacji oraz swobodną rotację w obrębie łańcuchów kwasów tłuszczowych. Taka fazę określa się jako pofałdowaną fazę żelową (ang. *rippled gel phase*, Pβ), a przemianę z Lβ do Pβ, przedprzejściem [Koynova, 1998; Lewis i McElhaney, 2005]. Kiedy temperatura wzrośnie do 41 °C dwuwarstwa lipidowa przechodzi do fazy ciekłokrystalicznej (ang. *liquid-crystalline phase*, Lα) [Koynova, 1998]. Faza ta charakteryzuje się najwyższym stopniem uporządkowania, swobodą ruchu, rozluźnieniem warstw oraz dużą płynnością [Lewis i McElhaney, 2005].



Ryc. 8. Przejścia fazowe dwuwarstwy lipidowej [Startek i in., 2019].

1.6.6. Dynamiczne właściwości błon biologicznych

W warunkach fizjologicznych błony komórkowe występują w fazie ciekłokrystalicznej, co oznacza dużą swobodę ruchu cząsteczek. Dynamika membran biologicznych wynika z braku wiązań kowalencyjnych, w związku z czym cząsteczki lipidów oraz białka błonowe są w ciągłym ruchu. Zarówno lipidy jak i białka mogą wykonywać 3 rodzaje ruchów, a są to dyfuzja rotacyjna, dyfuzja lateralna oraz dyfuzja poprzeczna (ruch flip-flop). Ruch obrotowy zachodzi wokół osi prostopadłej do płaszczyzny błony. W warunkach fizjologicznych zarówno lipidy jak i białka obracają się wokół własnej osi z częstotliwością 10^8-10^9 s^{-1} (lipidy) i 10^3-10^5 s^{-1} (białka). Wszystkie białka, nawet te zakotwiczone wykazują zdolność do ruchów rotacyjnych a wpływ na ich rotację powoduje utratę funkcjonalności. Dyfuzja lateralna polega na przemieszczaniu się cząsteczek lipidów

i białek w płaszczyźnie błony. Współczynniki dyfuzji dla lipidów i białek wynoszą odpowiednio 10^{8}-10^{9} cm^2 s^{-1} i 10^{9}-10^{11} cm^2 s^{-1}. Z kolei ruchy flip-flop polegają na przechodzeniu cząsteczki pomiędzy warstwą wewnętrzną a zewnętrzną błony (lub na odwrót). Dawniej uważano, że zjawisko to jest niemożliwe ze względu na barierę energetyczną, jaką lipidy musiałyby pokonać. Obecnie wiadomo, że takie ruchy mogą mieć miejsce. Jest to związane z obecnością flipaz – białek transportujących lipidy [Goñi, 2014].

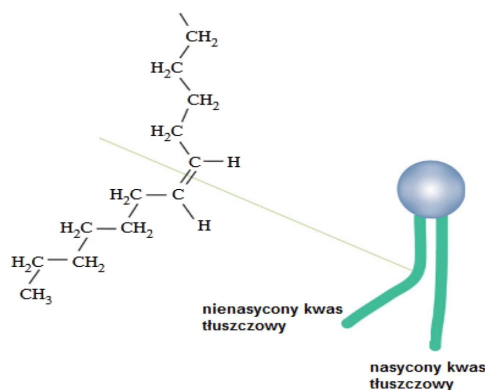
1.6.7. Płynność błon biologicznych

Cechą charakterystyczną błon biologicznych jest ich płynność, która określana jest przez zdolność cząsteczek tworzących membrany do wykonywania różnego rodzaju ruchów, m.in. oscylacyjnych, rotacyjnych i translacyjnych [Przestalski, 1989]. Zależy ona zarówno od czynników zewnętrznych takich jak temperatura, ciśnienie, pH, jak i wewnętrznych. Do czynników wewnętrznych można zaliczyć m.in. skład lipidowy błony, dynamikę lipidów oraz właściwości łańcuchów acylowych kwasów tłuszczowych [Kubica i in., 2003].

Wzrost temperatury powoduje zwiększenie ruchliwości lipidów i rozluźnienie struktury błony co prowadzi do jej upłynnienia. Z kolei jej obniżenie wiąże się z ograniczeniem ruchów poszczególnych składników membran i ich usztywnieniem. Równie istotnym parametrem jest ciśnienie. Gdy ciśnienie wzrasta zmniejsza się przestrzeń, którą zajmują cząsteczki lipidów, co skutkuje większym uporządkowaniem łańcuchów węglowodorowych i zmniejszeniem płynności [Zalba i Hagen, 2017]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na płynność błony jest pH. Zmiany tego parametru mogą zmieniać ładunek głów polarnych fosfolipidów, co wpływa na ich wzajemne oddziaływania. W zależności od składu membran, wzrost pH może powodować zwiększenie lub zmniejszenie ich płynności. Innym czynnikiem decydującym o stopniu uporządkowania błony są jony Ca^{2+}. Jony te oddziałując z ujemnie naładowanymi głowami fosfolipidów znoszą ich wzajemne odpychanie. Prowadzi to do ściślejszego upakowania składników błony i jej usztywnienia [de la Serna i in., 2016; Kubica i in., 2003, Leśniak i Porembska, 1993].

Czynnikiem wewnętrznym modulującym płynność błony są właściwości łańcuchów kwasów tłuszczowych. Istotny wpływ ma stopień ich nasycenia. Obecność nasyconych kwasów tłuszczowych sprzyja upakowaniu cząsteczek lipidów i zmniejsza jej płynność. Jest

to związane z tym, że takie łańcuchy są wyprostowane, co umożliwia oddziaływania między sobą za pomocą wiązań van der Waalsa. Z kolei występowanie jednego lub kilku wiązań podwójnych w konfiguracji cis powoduje zgięcie łańcuchów węglowodorowych (Ryc. 9), co prowadzi do zmniejszenia stopnia upakowania cząsteczek fosfolipidów w błonie, a zatem do zwiększenia płynności. Płynność błon zależy również od długości kwasów tłuszczowych. Długie łańcuchy węglowodorowe oddziałują ze sobą silniej niż krótkie, co zmniejsza zakres ruchów segmentalnych i wpływa na usztywnienie błony [Stryer, 2003].



Ryc. 9. Wpływ wiązań podwójnych na ułożenie łańcuchów kwasów tłuszczowych [Monteiro, 2014].

W komórkach zwierzęcych istotnym czynnikiem jest zawartość cholesterolu. Gdy błona znajduje się w fazie ciekłokrystalicznej sztywna, pierścieniowata struktura cząsteczki tego związku ogranicza ruchy fosfolipidów, co zmniejsza płynność błon i stabilizuje ich strukturę. Z kolei obecność cholesterolu w dwuwarstwie lipidowej w fazie żelowej wywołuje odwrotny efekt: powoduje upłynnienie błony. Innym lipidem modulującym płynność membran jest sfingomielina. Cząsteczka tego związku zawiera grupy aminową i hydroksylową, które umożliwiają tworzenie wiązań wodorowych, prowadząc do wzajemnych oddziaływań sąsiednich cząsteczek i ich ścisłego upakowania [Zalba i Hagen, 2017].

Płynność jest ważną cechą błon komórkowych wpływającą na wiele procesów błonowych takich jak transport czy przekazywanie sygnałów. Ponadto, warunkuje takie właściwości komórki jak odkształcalność, stabilność mechaniczną i osmotyczną oraz funkcjonowanie receptorów błonowych. Nawet niewielkie zmiany w płynności błon mogą wpływać na funkcjonowanie komórek [Gennis, 1989].

1.6.8. Różnice w budowie błon komórek prawidłowych i nowotworowych

Komórki nowotworowe różnią się od komórek normalnych właściwościami chemicznymi, strukturalnymi, metabolicznymi i biofizycznymi. Głównymi cechami tych komórek są zdolność do indukowania angiogenezy, nieśmiertelność, niekontrolowane namnażanie czy zdolność do inwazji i przerzutów. Wszystkie te procesy są związane z różnicami w składzie lipidów w porównaniu do komórek prawidłowych. Niekontrolowana proliferacja tych komórek wymaga dostarczenia niezbędnych biomolekuł, w tym kwasów tłuszczowych oraz lipidów błonowych. W konsekwencji, w komórkach zmienionych nowotworowo dochodzi do konstytutywnej aktywacji biosyntezy kwasów tłuszczowych, które są potrzebne do tworzenia nowych błon [Alves i in., 2016]. W porównaniu do komórek prawidłowych, komórki nowotworowe różnią się składem lipidowym co przedstawia rycina 10. Zmiany w profilach fosfolipidów oraz kwasów tłuszczowych zaobserwowano w przypadku nowotworów piersi, jelita grubego oraz nowotworów opornych na chemioterapię. W warstwie zewnętrznej błony w komórkach raka wątroby odnotowano zwiększony poziom nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz czterokrotnie większy poziom sfingomieliny (SM) niż w komórkach prawidłowych [Selkirk i in., 1971]. W przypadku raka jelita grubego stwierdzono, wyższą zawartość wszystkich fosfolipidów, w tym fosfatydyloinozytolu (PI), fosfatydyloseryny (PS), fosfatydyloetanoloaminy (PE) oraz fosfatydylocholiny (PC) [Baró i in., 1998]. W błonach komórkowych wielu nowotworów obserwuje się obniżony poziom SM, co ma też związek z tworzeniem się guzów. Ponadto, w wyniku procesu nowotworzenia zmienia się stosunek lipidów cholinowych do aminowych. W większości przypadków spada zawartość lipidów etanoloaminowych a wzrasta lipidów cholinowych [Slagel i in., 1967]. Transformacja nowotworowa wpływa również na ekspresję gangliozydów. W zależności od rodzaju nowotworu oraz stopnia jego zaawansowania obserwuje zwiększoną ilość tych związków [Sonnino i in., 2007].

Błony komórek prawidłowych charakteryzują się asymetrycznym rozmieszczeniem lipidów w wewnętrznej i zewnętrznej warstwie błony komórkowej. Lipidy obojętne takie jak fosfatydylocholina (PC) czy sfingomielina (SM) rozmieszczone są warstwie zewnętrznej biomembrany, z kolei aminofosfolipidy takie jak fosfatydyloetanoloamina (PE) oraz fosfatydyloseryna (PS) występują głównie po stronie cytozolowej. Taka lokalizacja PS warunkuje ujemny ładunek powierzchniowy wewnętrznej warstwy błon co wpływa na wiele mechanizmów sygnalizacyjnych, takich jak hydroliza lipidów sygnalizacyjnych. Ponadto, obecność PS i PE po stronie cytozolowej stabilizuje interakcje błony z cytoszkieletem. W

stanach patologicznych, w tym nowotworach dochodzi do zaburzenia asymetrii lipidów. Obserwuje się przemieszczenie fosfatydyloseryny do warstwy zewnętrznej błony co powoduje, że takie komórki mają ujemy ładunek powierzchniowy [Riedl i in., 2011; Zwaal i in., 2005]. Ponadto, koreluje to z kwaśnym pH środowiska zewnątrzkomórkowego. Obecność PS oraz PE w warstwie zewnętrznej błony stwierdzono w komórkach guza śródbłonka [Stafford i Thorpe, 2011].

Oprócz zmian w profilach fosfolipidowych oraz w konsekwencji zmian w ładunku powierzchniowym błon, w komórkach nowotworowych dochodzi do zmiany płynności błony. Płynność jest ważnym parametrem błon biologicznych. Wskazuje drogę oraz szybkość ruchów cząsteczek w błonie i jest odwrotnie skorelowana z lepkością błony. Parametr ten w dużej mierze zależy od składu lipidowego oraz zawartości cholesterolu. Szereg przeprowadzonych badań wskazuje na istnienie związku pomiędzy płynnością błony a zaawansowaniem zmian nowotworowych komórki. Proliferacja komórek nowotworowych, stopień złośliwości nowotworu oraz jego zdolność do przerzutów są ściśle związane ze zmianami w płynności błony. Inbar i Shinitzky wykonując pomiary mikroskopowej lepkości błon komórek białaczki oraz niezmienionych chorobowo leukocytów wykazali, że lepkość zdrowych komórek jest dwa razy większa niż lepkość komórek nowotworowych. Na tej podstawie wysunęli wniosek, że błony komórek nowotworowych są bardziej płynne niż błony komórek prawidłowych [Inbar i Shinitzky, 1974]. Podobną zależność potwierdzono w przypadku innych nowotworów [Sok i wsp., 1999; Nakazawa i wsp., 1989; Rybczyńska i wsp., 2001; Berra i wsp. 1994; Koijma 1993]. Było to związane z niższym stosunkiem cholesterolu do fosfolipidów (Chol:PL), wynikającym z obniżonej zawartości tego sterolu w błonach komórek rakowych. Wartość tego stosunku jest różna w zależności od typu nowotworu i jest wyższa im większa jest złośliwość. W komórkach nowotworowych często dochodzi do zmian w metabolizmie cholesterolu co powoduje obniżenie lub podwyższenie jego zawartości [Hendrich i Michalak, 2003; Subczyński i Wiśniewska, 2000; Peetla i in., 2013]. Badania na liniach komórkowych raka prostaty i piersi wykazały wyższe stężenie tego sterolu w stosunku do komórek zdrowych. Poziom cholesterolu może różnić się w zależności od rodzaju nowotworu, jego stadium oraz wrażliwości. W komórkach wysoce przerzutujących zaobserwowano niższe stężenie cholesterolu, dzięki czemu mają one większa zdolność do odkształcenia błony i mogą łatwiej przenikać do naczyń krwionośnych [Hendrich i Michalak, 2003]. Z kolei nowotwory oporne na chemioterapię charakteryzują się wyższą

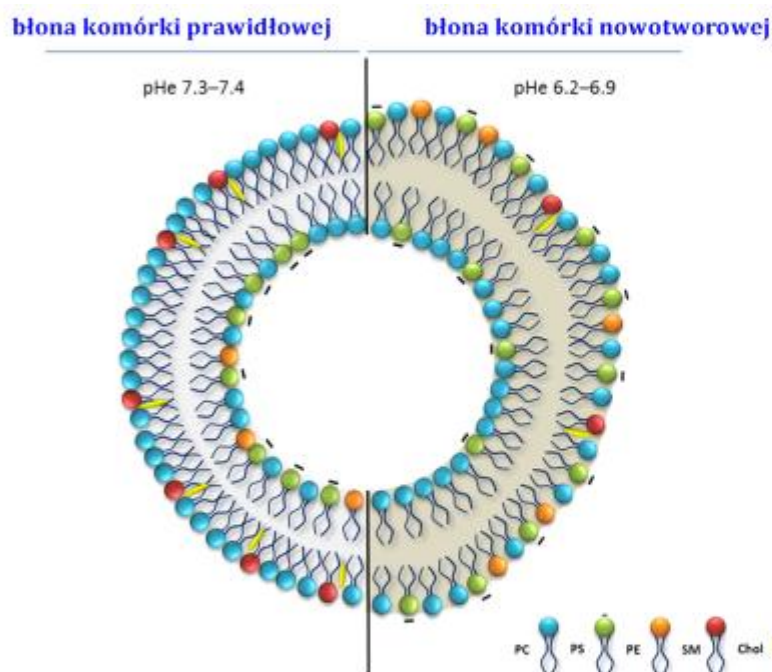
zawartość tego sterolu, który powoduje usztywnienie ich błony, w związku z czym staje się ona nieprzepuszczalna dla cytostatyków [Hendrich i Michalak, 2003; Eytan i in., 1996; Niero i in., 2014]. Oprócz wyższego poziomu cholesterolu, w tych komórkach obserwuje się wzrost zawartości fosfolipidów (PC, PE oraz PI) oraz wyższy stosunek białek do lipidów (do 60%) w porównaniu do komórek prawidłowych [Cohen i in., 2004; Hendrich i Michalak, 2003; Peetla i in., 2013]. Komórki mysiej białaczki P338 oporne na doksorubicynę charakteryzują się usztywnieniem błony oraz niższym stosunkiem PC/SM. Zespół Peetla zaobserwował wyższy poziom SM, PI oraz cholesterolu w komórki raka piersi opornego na doksorubicynę (MCF-7/ADR) w porównaniu do komórek wrażliwych na ten chemioterapeutyk. Ponadto, w błonach komórek opornych na chemioterapię odnotowano wzrost ilości transporterów takich jak p-glikoproteina odpowiedzialnych za aktywne wypompowywanie leków z cytoplazmy na zewnątrz komórki [Peetla i in., 2013].

Innym lipidem wpływającym na płynność błony jest sfingomielina. Podobnie jak cholesterol powoduje usztywnienie błony. Badania Gottfrieda potwierdzają, że w komórkach białaczki błony mają niski poziom tego fosfolipidu [Gottfried, 1967]. Podobnie jest w przypadku wątrobiaków, gdzie w porównaniu ze zdrowymi komórkami wątroby, poziom sfingomieliny oraz innych fosfolipidów choinowych spada [Kojima, 1993]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na płynność błony jest stopień nasycenia łańcuchów węglowodorowych. Wzrost ilości fosfolipidów o nienasyconych łańcuchach acylowych powoduje zwiększenie płynności błony [Zalba i Hagen, 2017].

Wzrost ilości cholesterolu sprzyja powstawaniu tratw lipidowych [Cohen i in., 2004; Hendrich i Michalak, 2003; Hryniewicz-Jankowska i in., 2014]. Domeny te, w zależności od rodzaju białek w nich zlokalizowanych biorą udział w proliferacji, różnicowaniu, apoptozie i migracji. Zmiany w obrębie tratw lipidowych mogą być zaangażowane w powstawanie złośliwych zmian, niekontrolowany wzrost, inwazyjność oraz przerzuty [Hryniewicz-Jankowska i in., 2014]. Duża ilość tratw w komórkach nowotworowych powoduje nadekspresję receptorów czynników wzrostu takich jak EGFR, IGF-1 czy Sigma. W tych domenach znajdują się również takie białka jak integryny, adhezyny, receptory CD44 oraz CD24, biorące udział w progresji i inwazji nowotworu [Head i in., 2014; Hryniewicz-Jankowska i in., 2014; Tekpli i in., 2013; Zhuang i in., 2002].

Skutecznym mechanizmem związanym z opornością na leki jest zmiana metabolizmu ceramidu. W komórkach oporności wielolekowej dochodzi do obniżenia jego zawartości. Jest to związane ze zmniejszeniem aktywności sfingomielinazy bądź ze zwiększeniem

poziomu sfingomieliny (SM). W wyniku czego obserwuje się niski poziom tratw lipidowych typu drugiego (bogatych w ceramid), co zapobiega apoptozie takich komórek [Zabla i Hagen, 2017].

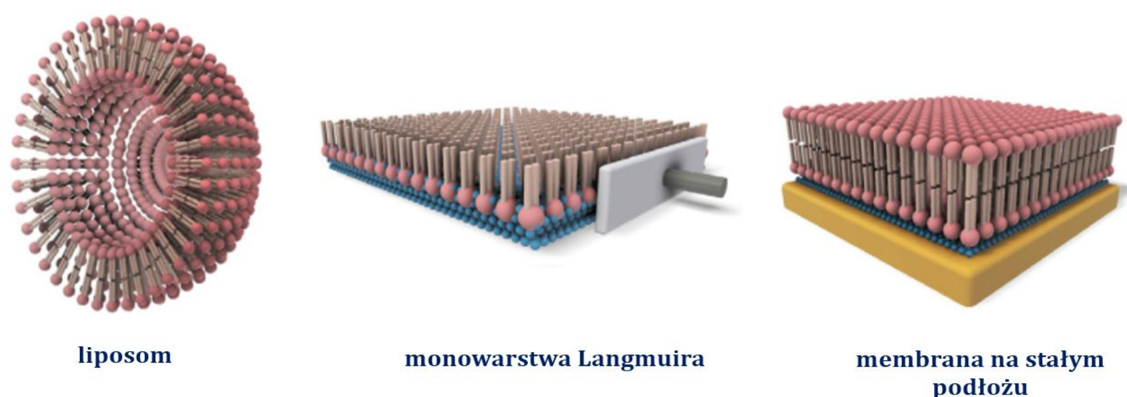


Ryc. 10. Różnice w składzie lipidowym pomiędzy błoną komórki prawidłowej i zmienionej nowotworowo [Alves i in., 2016].

1.6.9. Sztuczne modele błon biologicznych

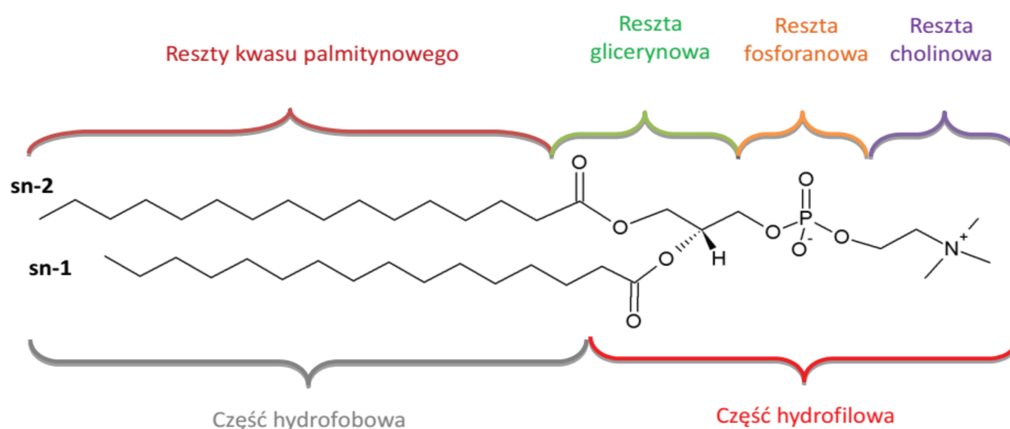
Błona biologiczna jest strukturą o złożonej budowie, w której zachodzą liczne procesy biologiczne, co skłania do prowadzenia badań na poziomie molekularnym, przy wykorzystaniu sztucznych, uproszczonych modelowych układów lipidowych. Modele błon pozwalają poznać zjawiska zachodzące w błonach, zrozumieć oddziaływania między cząsteczkami oraz zbadać wpływ substancji np. leków na ich właściwości fizykochemiczne. Najprostsze układy składają się z jednego rodzaju lipidu ale stosuje się również membrany zawierające mieszaninę kilku naturalnych lub syntetycznych lipidów [Hąc-Wydro i Dynarowicz-Łątka, 2010]. Błony uformowane z naturalnych lipidów mają cechy zbliżone do błon biologicznych. Z kolei syntetyczne lipidy pozwalają na tworzenie membran o określonych parametrach, takich jak płynność, grubość, ładunek powierzchniowy czy właściwości spektroskopowe. Najczęściej wykorzystywanymi modelami błon

biologicznych są liposomy, monowarstwy Langmuira oraz membrany osadzone na stałych podłożach (Ryc.11) [Knobloch i in., 2015].



Ryc. 11. Sztuczne modele błon komórkowych [Knobloch i in., 2015].

Głównym fosfolipidem stosowanym w preparacji sztucznych błon lipidowych jest dipalimitylofosfatydylocholina (DPPC), której cząsteczkę przedstawia rycina 12.

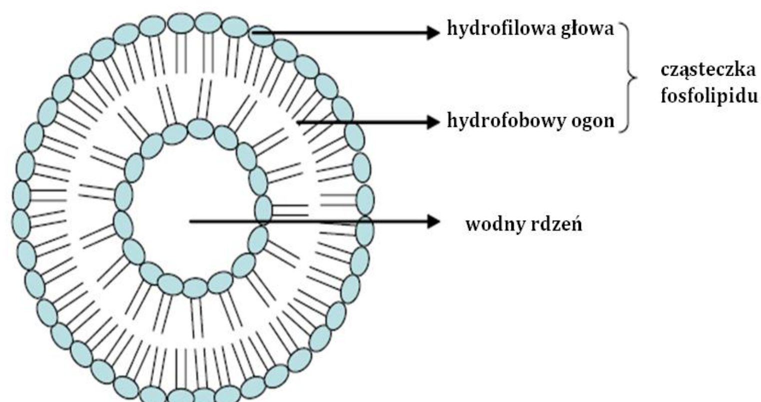


Ryc. 12. Schemat budowy cząsteczki dipalmitylofosfatydylocholiny [Litwińczuk-Mammadova i in., 2016].

1.6.10. Liposomy

Liposomy po raz pierwszy zostały odkryte przez brytyjskiego hematologa dr Aleca D Banghama w 1964 roku. Są to mikroskopijne, zamknięte struktury błonowe o sferycznym kształcie. Występują w postaci pęcherzyków składających się z wodnego rdzenia

otoczonych jedną lub kilkoma dwuwarstwami lipidowymi (Ryc. 13). Ich wielkość waha się w granicach 0,01-10 μm. [Zhong i Dai, 2012; Dua i in., 2012; Kumar i in., 2012].



Ryc. 13. Budowa liposomu [Swaminathan i Ehrhardt, 2011].

Możemy je sklasyfikować ze względu na: wielkość i liczbę dwuwarstw, sposób ich otrzymywania, właściwości powierzchniowe oraz zastosowanie. Pod względem rozmiaru i liczby dwuwarstw liposomy możemy podzielić na:

- Liposomy jednowarstwowe (ang. unilamellar vesicles, UVs)

  - **małe liposomy jednowarstwowe (ang. small unilamellar vesicles, SUVs)**- są to struktury o średnicy 0,02-0,1 μm. Liposomy te mają ograniczone zastosowanie jako modele błon komórkowych i nośniki substancji leczniczych o charakterze hydrofilowym. Z kolei ich małe rozmiary sprzyjają dystrybucji terapeutyków w organizmie,

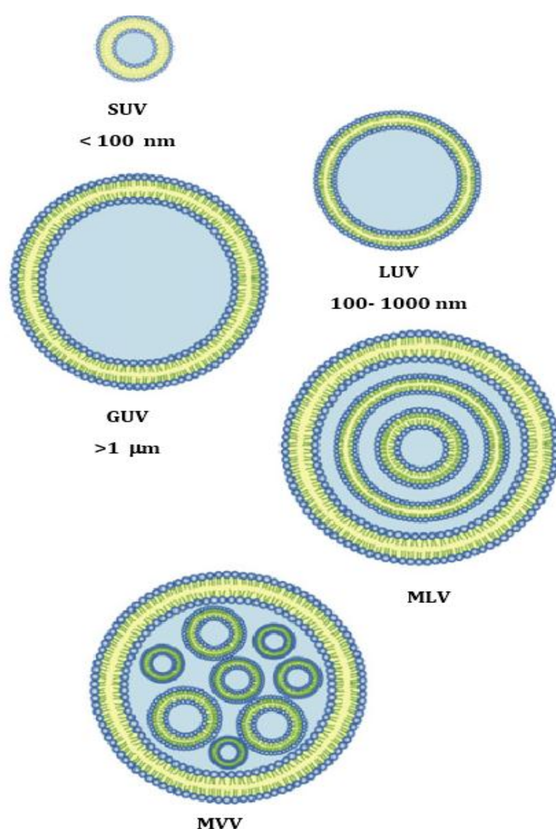
  - **duże liposomy jednowarstwowe (ang. large unilamellar vesicles, LUVs)**- do tej grupy zaliczamy struktury o średnicy 0,1-1 μm, mają zastosowanie jako modele błon komórkowych i nośniki substancji hydrofilowych oraz makromolekuł,

  - **wielkie liposomy jednowarstwowe (ang. giant unilamellar vesicles, GUV)**- są to pęcherzyki o rozmiarach powyżej 1 μm,

- **Liposomy kilkuwarstwowe (ang. oligolamellar vesicles, OLVs)**, o rozmiarze 0,1-0,5 μm, w których rdzeń wodny otoczony jest przez kilka dwuwarstw,

- **Liposomy wielowarstwowe (ang. multilamellar vesicles, MLVs)** – są to struktury o rozmiarach powyżej 0,5 μm, w których rdzeń wodny otoczony jest przez kilka do kilkunastu dwuwarstw lipidowych (5-25), mają większą zdolność do przyłączania cząsteczek lipofilnych. Ich wadą jest to, że są natychmiast wychwytywane przez komórki układu fagocytarnego,
- **Wielopęcherzykowe liposomy (ang. multivesicular vesicles, MVVs)** – charakteryzują się średnicą powyżej 1 μm i powstają jako produkt uboczny w czasie wytwarzania MLV. W tego typu liposomach jedna dwuwarstwa lipidowa otacza kilka mniejszych pęcherzyków [Muller i in., 2003; Kulkarni i in., 1995; Sharma i Sharma, 1997, Litwińczuk-Mammadova i in., 2016].

Podział liposomów ze względu na rozmiar i liczbę dwuwarstw przedstawia rycina 14.



Ryc. 14. Podział liposomów ze względu na rozmiar i liczbę dwuwarstw [Vahed i in., 2017].

Liposomy znalazły zastosowanie jako modele dwuwarstwy lipidowej błony jak również jako nośniki wielu substancji aktywnych. Jest to związane z możliwością umieszczenia w nich związków zarówno o charakterze hydrofilowym (w obrębie warstwy hydrofilowej), hydrofobowym (w obrębie dwuwarstwy lipidowej) i amfifilowych.

Dodatkowo wysoko biokompatybilność i biodegradowalność jak również niska toksyczność sprawiają, że są coraz częściej stosowane jako nośniki substancji terapeutycznych. Substancje biologiczne zamknięte wewnątrz liposomów są chronione przed rozcieńczeniem czy działaniem enzymów proteolitycznych. Z tego względu pęcherzyki lipidowe są często wykorzystywane do dostarczania leków antybakteryjnych, przeciwwirusowych czy przeciwnowotworowych, w tym także enzymów i hormonów do określonych komórek i tkanek. Przykładem mogą być daunorubicyna oraz doksorubicyna stosowane w leczeniu nowotworów, które są zamknięte w formulacji liposomowej [Samand i in., 2007; Kaur i in., 2013; Allen i Cullis, 2013]. Liposomy mają zdolność do przenoszenia DNA, RNA oraz całych kompleksów białkowo-nukleotydowych dlatego mogą być stosowane jako nośniki genów w terapiach genowych [Lian i Ho, 2001; Sipai i in., 2012]. Ponadto, mogą być wykorzystywane w dermatologii i kosmetologii do dostarczania substancji aktywnych w głąb skóry [Sipai i in., 2012].

1.6.10.1. Metody otrzymywania liposomów

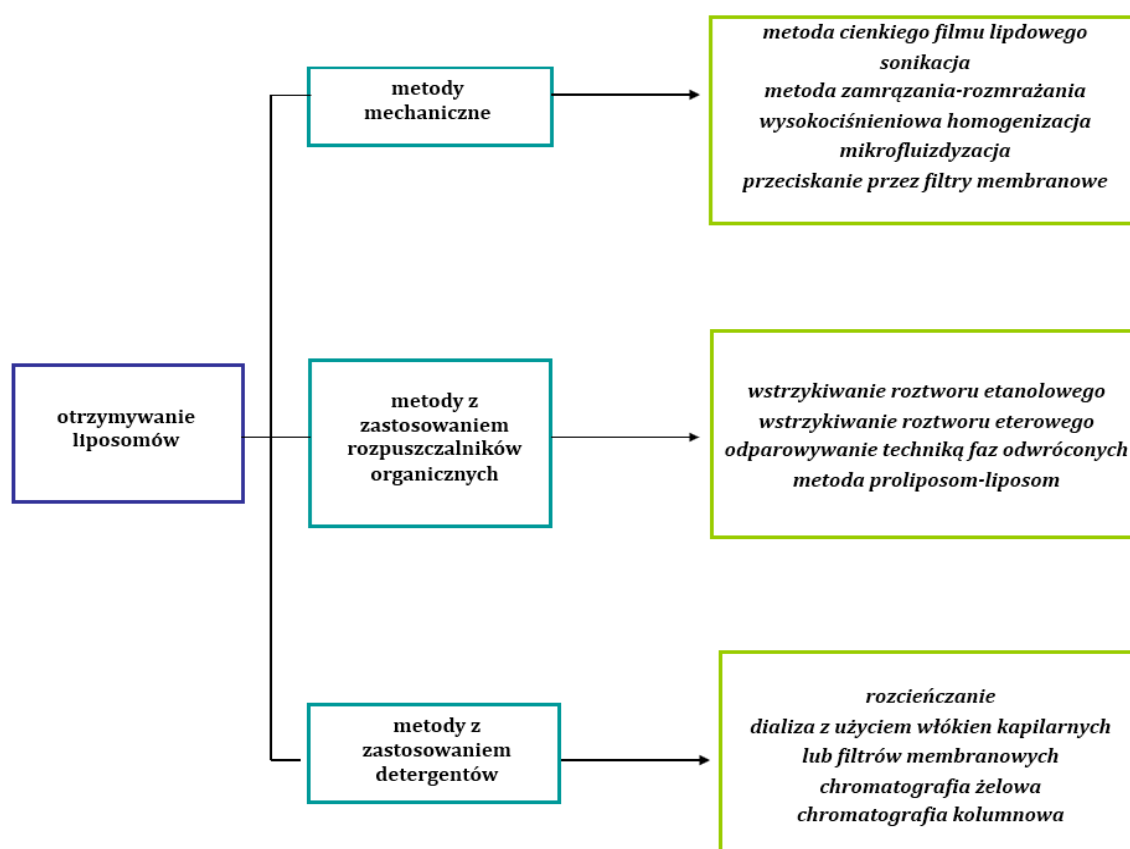
Wszystkie metody preparatyki liposomów polegają na wprowadzeniu cząsteczek lipidów do roztworu wodnego. Powszechne wykorzystanie liposomów do transportu substancji o charakterze hydrofilowym i hydrofobowym, rozwój technologii liposomowej, jak również konieczność pozyskiwania liposomów różnych typów, zarówno na skalę laboratoryjną jak i przemysłową przyczyniło się do opracowania różnych metod ich otrzymywania, które powinny być przede wszystkim wydajne, odtwarzalne oraz możliwie najprostsze.

Wybór metody przygotowania liposomów zależy od kilku parametrów:

- charakterystyki głównych składników strukturalnych liposomów
- charakterystyki, stężenia oraz toksyczności materiałów, które będą zamykane wewnątrz liposomów
- charakteru ośrodka, w którym rozproszone są pęcherzyki lipidowe
- dodatkowych procesów związanych z dostarczaniem liposomów
- optymalnego rozmiaru, polidyspersyjności i trwałości pęcherzyków wykorzystywanych do określonych zastosowań

- odtwarzalności metody oraz możliwości produkcji na dużą skalę [Silver-Marinkovic, 2016].

Metody otrzymywania lipidów możemy podzielić na trzy grupy: metody mechaniczne, metody z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych oraz metody z zastosowaniem detergentów [Lasic, 1996] (Ryc.15).



Ryc. 15. Metody otrzymywania liposomów [Silver-Marinkovic, 2016].

1.7. Oddziaływanie flawonoidów z błonami

Błona plazmatyczna oraz błony otaczające wewnątrzkomórkowe kompartmenty są jednymi z miejsc oddziaływania flawonoidów. Struktura ta stanowi swoistą barierę dla cząsteczek dostających się do komórki dlatego zdolność do interakcji zarówno z dwuwarstwą lipidową, jak i białkami błonowymi ma istotny wpływ na ich mechanizm działania. Aktywność biologiczna związków jest związana zarówno ze sposobem ich

interakcji z membraną, jak również miejscem ich lokalizacji i czasem przebywania w błonie [Selvaraj i in., 2015]. Flawonoidy wpływają zarówno na właściwości dwuwarstwy lipidowej takie jak płynność, przepuszczalność, integralność, właściwości elektryczne, jak również na aktywność białek integralnych w tym enzymów i receptorów związanych z błoną, transport błonowy oraz inne procesy związane z membranami. Takie działanie jest ważne z biologicznego jak i medycznego punktu widzenia ponieważ jest skorelowane z ich aktywnością antyoksydacyjną, przeciwnowotworową, przeciwdrobnoustrojową oraz przeciwzapalną [Tsuchiya, 2011; Wu i in., 2013; Tsuchiya, 2010; Margina i in., 2012; Cyboran i 2015].

Istotnym czynnikiem wpływającym na interakcje flawonoidów z błoną jest ich struktura chemiczna. Zarówno konfiguracja, stopień polimeryzacji, liczba i rozmieszczenie grup hydroksylowych, obecność reszt cukrowych jak również obecność grup metylowych w pierścieniu C decydują o typie oddziaływania tych związków z błoną. Liczba i rozmieszczenie grup hydroksylowych wpływa na hydrofobowość cząsteczek i ma duże znaczenie w sposobie ich interakcji z błoną [Oteiza i in., 2005]. Ważną rolę w oddziaływaniach pomiędzy związkami flawonoidowymi a błoną odgrywa ich struktura przestrzenna oraz obecność reszt cukrowych. Flawonoidy zawierające podwójne wiązanie w pierścieniu B oraz nie mające podstawnika glikozydowego mają płaską strukturę, a co za tym idzie charakteryzują się większym powinowactwem do membran. Z kolei metylacja grup hydroksylowych galusanu epigalokatechiny powoduje obniżenie jego powinowactwa do dwuwarstwy lipidowej [Havsteen, 2002].

Ponadto, oddziaływania elektrostatyczne, tworzenie wiązań wodorowych z głowami cholinowymi fosfolipidów, oddziaływania hydrofobowe z łańcuchami acylowymi kwasów tłuszczowych oraz molekularna geometria samych fosfolipidów wpływają na wbudowywanie się flawonoidów do membran [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2007].

Duże znaczenie w interakcji tych związków z błonami ma ich hydrofobowość. W zależności od charakteru flawonoidu istnieją dwa prawdopodobne mechanizmy ich oddziaływania z błoną lipidową. Związki hydrofilowe są adsorbowane na powierzchni błony i oddziałują z głowami polarnymi fosfolipidów poprzez wiązania wodorowe. Jest to możliwe dzięki obecnością licznych grup hydroksylowych i wiąże się to z ich ochronnym działaniem wobec różnych szkodliwych czynników. Z kolei flawonoidy o charakterze hydrofobowym wnikają w niepolarny rejon błony [Erlejman i in., 2004; Oteiza i in., 2005].

Interakcje z dwuwarstwą lipidową zależą również od pH, które określa ładunki elektrostatyczne flawonoidów oraz cząsteczek lipidów. Niższe pH powoduje mniejszą deprotonację grup polarnych, a tym samym głębszą penetrację flawonoidów w dwuwarstwę lipidową. Movileanu i współpracownicy wykazali, że lokalizacja kwercetyny w dwuwarstwie lipidowej zależy od wartości tego parametru. Przy kwaśnym pH flawonol ten wchodzi głęboko w dwuwarstwę lipidową podczas gdy w fizjologicznym pH oddziałuje z głowami polarnym fosfolipidów na granicy lipid-woda [Movileanu i in., 2000].

Lokalizacja flawonoidów w różnych rejonach błony prowadzi do jej upłynnienia lub usztywnienia. Związki te wchodząc w interakcje z fosfolipidami tworzącymi dwuwarstwę lipidową mogą ograniczać ruchy ich łańcuchów acylowych przez co przesuwają temperaturę przejścia fazowego w stronę wyższych wartości lub zmieniać ich upakowanie co z kolei obniża Tm [Selvaraj i in., 2015]. Zdolność flawonoidów do zmiany płynności membrany decyduje o charakterze ich biologicznych aktywności. Takie działanie znacząco wpływa na funkcjonowanie enzymów i receptorów błonowych, a zatem też na szlaki sygnalizacyjne, w których pośredniczy błona. Większość badanych flawonoidów powoduje obniżenie płynności membran. Flawanony i izoflawony wbudowując się w hydrofobowy rdzeń dwuwarstwy lipidowej powodują zmniejszenie płynności [Arora i in., 2000]. Badania z użyciem fluorescencyjnych znaczników wykazały, że silniejsze działanie usztywniające mają związki oddziałujące na głębsze regiony błony. Liczne badania dowodzą, że flawonoidy powodują usztywnienie błon komórek nowotworowych, które charakteryzują się większą płynnością w porównaniu do komórek prawidłowych. Wyniki otrzymane przez zespół Tsuchiya potwierdzają usztywniające działanie EGC, genisteiny i apigeniny. Efekt ten powiązano z cytotoksycznym działaniem flawonoidów na komórki raka piersi. Badania prowadzone przez tę samą grupę potwierdzają też dualistyczne działanie kwercetyny, która w stężeniach 5-10 μmol/L zmniejszała płynność membrany, natomiast w niższych stężeniach powodowała odwrotny efekt. Zasugerowano, że takie działanie flawonolu jest związane z jego oddziaływaniem na powierzchni dwuwarstwy [Tsuchiya i in., 2002, Tsuchiya i in., 2008]. Podobne wyniki otrzymał zespół Pawlikowskiej-Pawlęgi w doświadczeniach na liposomach uformowanych z DPPC. Badania z zastosowaniem technik EPR, NMR i FTIR wykazały usztywniające działanie apigeniny i genisteiny w rejonie hydrofobowych łańcuchów alifatycznych jak również w strefie polarnych głów fosfolipidów. Z kolei kwercetyna lokalizując się w strefie głów cholinowych działała dualistycznie powodując upłynnienie części hydrofobowej i usztywnienie rejonu głów

polarnych. Wszystkie flawonoidy wbudowywały się do dwuwarstwy lipidowej za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy segmentem C-O-P-O-C głów polarnych fosfolipidów a grupami hydroksylowymi tych związków [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2012, 2013 i 2014]. Inne badania dotyczące flawonów takich jak eupafolina i hispidulina sugerują, że zmniejszenie płynności błony wywołane obecnością tych związków powoduje zahamowanie wzrostu komórek raka szyjki macicy [Herrerias i in., 2010]. Z kolei Tsuchiya zasugerował, że upłynnienie błony przez katechiny jest związane z ich hepatoprotekcyjnym działaniem [Tsuchiya, 1999]. Lokalizacja oraz oddziaływanie flawonoidów z błonami biologicznymi decyduje również o ich antyoksydacyjnej aktywności. Doniesienia literaturowe sugerują, że zarówno zmiany w płynności membran jak również lokalizacja tych związków w części powierzchniowej błony warunkują silniejsze działanie przeciwutleniające poprzez blokowanie interakcji wolnych rodników z lipidami błonowymi [Selvaraj i in., 2015].

Związki o charakterze flawonoidów wpływają także na właściwości elektryczne błony. Movileanu i współpracownicy badający efekty wbudowywania się kwercetyny w dwuwarstwę lipidową wykazali, że flawonol zaburza jej strukturę jak również zwiększa jej przewodnictwo i pojemność elektryczną [Movileanu i in., 2000]. Z kolei wyniki uzyskane przez zespół Pawlikowskiej-Pawlęgi potwierdziły, że apigenina i genisteina też powodują zmiany właściwości elektrycznych membran. W doświadczeniach z użyciem *Conocephalum conicum* obserwowano wzrost potencjałów czynnościowych u roślin traktowanych zarówno apigeniną jak i genisteiną [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2007, Pawlikowska-Pawlęga i in., 2009].

Związki te mogą również oddziaływać na białka integralne błon. Zespół Pawlikowskiej-Pawlęgi wykazał, że kwercetyna wpływa na białka cytoszkieletu oraz białka integralne błony erytrocytów powodując zmianę ich kształtu i wielkości [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2003]. Flawonoidy poprzez wpływ na działanie receptorów znajdujących się w błonach mają zdolność do modulowania szlaków sygnałowych. Ponadto, niektóre z nich mogą oddziaływać na białka transportowe obecne w błonach. Wiele badań wskazuje, że flawonoidy działają jako inhibitory białek oporności wielolekowej takich jak MRP1 i glikoproteiny-P w różnych liniach komórek nowotworowych. Są również modulatorami aktywności wielu enzymów błonowych takich jak: ATP-aza mitochondrialna, ATPaza zależna od jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , APTaza Na^{+} K^{+}, oraz fosfodiesteraza cAMP i cGMP, co

może mieć związek z ich aktywnością przeciwnowotworową [Graziani i Chayoth, 1979; Revuelta i in., 1997].

Flawonoidy wpływają również na działanie kanałów jonowych obecnych w błonie. W zależności od rodzaju kanału mogą je aktywować lub hamować. Kanałem aktywowanym przez te związki jest kanał CFTR, odpowiadający za transport jonów chlorkowych. Związki polifenolowe, w tym flawonoidy mogą wpływać na transport żelaza niehemowego. Na podstawie otrzymanych wyników, Hoque i jego zespół dowiedli, że kwercetyna hamuje wypływ żelaza przez ferroportynę, znajdującą się w podstawnej błonie komórek ludzkiego gruczolaka okrężnicy Caco-2 [Hoque i in., 2011]. Ponadto, związki te modyfikują działanie kanałów jonowych obecnych w naczyniach krwionośnych i sercu, co odgrywa istotną rolę w regulacji napięcia naczyń krwionośnych oraz jest związane z ich kardioprotekcyjnym działaniem. Przykładem może być genisteina będąca inhibitorem kanałów wapniowych w miocytach wyizolowanych z naczyń krwionośnych ucha królika. Związek ten przez zahamowanie napływu wapnia do komórek mięśni gładkich naczyń zapobiega ich depolaryzacji i zwężeniu naczyń krwionośnych, co wiąże się z obniżeniem ciśnienia krwi. Flawonoidy wpływają na działanie kanałów potasowych obecnych w naczyniach krwionośnych takich jak kanały wrażliwe na ATP, kanały potasowe zależne od potencjału czy aktywowane jonami wapnia [Scholz i in., 2010]. Badania Matsui i współpracowników wykazały, że procyjanidyny obecne w jabłkach powodują rozkurcz pierścieni aorty szczura poprzez aktywację kilku kanałów potasowych [Matsui i in., 2009]. Z kolei związki polifenolowe obecne w czerwonych winogronach takie jak kwercetyna, katechina oraz resweratrol hamują kanały sodowe obecne w sercu, co może przeciwdziałać arytmii [Wallace i in., 2006].

Niektóre flawonoidy i ich pochodne charakteryzują się przeciwdrobnoustrojowym działaniem. Takie właściwości mogą być związane z ich zdolnością do zmian płynności błon mikroorganizmów. Wpływa to również na jej przepuszczalność i prowadzi do zakłócenia metabolizmu, a w rezultacie do śmierci komórki [Selvaraj i in., 2015]. Liczne badania wskazują, że błony lipidowe stanowią jeden z celów antybakteryjnego działania katechin. Związki te powodują wyciek małych sond fluorescencyjnych takich jak kalceina czy karboksyfluoresceina z wnętrza małych jednowarstwowych liposomów (SUV) i dużych jednowarstwowych liposomów uformowanych z fosfatydylocholiny, co sugeruje uszkodzenie błon lipidowych. Podobne wyniki otrzymał zespół Tamba, który w swoich doświadczeniach z galusanem epigalokatechiny zastosował wielkie jednowarstwowe

liposomy (GUVy) jak model błony bakteryjnej. Związek ten powodował zmiany kształtu GUVów, indukował ich agregacje oraz pękanie i wyciek kalceiny [Tamba i in., 2007]. Na tej podstawie, stwierdzono, że katechiny działając na błony bakteryjne uszkadzają je. Aby wyjaśnić to zjawisko naukowcy zaproponowali dwie teorie. Po pierwsze zasugerowano, że związki te poprzez bezpośrednią penetrację i zaburzenia funkcji dwuwarstwy lipidowej powodują jej zakłócenia. Równocześnie katechiny mogą powodować fuzję błon co prowadzi do ich agregacji [Ikigai i in., 1993].

Interakcje flawonoidów z błonami biologicznymi mogą być również jednym z mechanizmów ich przeciwgrzybiczego działania. Wykazano, że apigenina hamuje rozwój takich organizmów jak *C. albicans, C. parapsilosis, Malassezia furfur, T. rubrum* oraz *T. beigelii* poprzez zaburzenia ich błon komórkowych, co prowadzi do zmniejszenia rozmiaru komórek oraz wycieku wewnątrzkomórkowych składników [Lee i in., 2018].

Niektóre związki flawonoidowe charakteryzują się selektywnością i oddziałują z wyspecjalizowanymi obszarami błony, a mianowicie z tratwami lipidowymi, w których obecne są białka biorące udział w transporcie oraz przekazywaniu sygnałów komórkowych. Przykładem takiego związku jest EGCG, który wpływa na receptory lamininy oraz naskórkowego czynnika wzrostu znajdujące się w obrębie tratw lipidowych, co prowadzi do aktywacji sygnałów biorących udział w reakcjach alergicznych oraz proliferacji komórek [Tachibana, 2011]. Ponadto katechiny z zielonej herbaty indukują oksydazę hemową obecną w tratwach lipidowych dzięki czemu wykazują aktywność przeciwmiażdżycową [Zheng i in., 2012].

II. Cel pracy

Flawonoidy są związkami roślinnymi o szerokim spektrum działania, wykazującymi wiele właściwości biologicznych i farmakologicznych takich jak właściwości antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne i wiele innych. Jednym z miejsc oddziaływania flawonoidów w komórkach są błony komórkowe, a wyjaśnienie interakcji pomiędzy błonami a tymi związkami może przyczynić się do bliższego poznania molekularnych mechanizmów ich działania na komórki i w przyszłości może okazać się istotne dla terapii wielu chorób, w tym chorób nowotworowych.

Lenzozyd Aβ należy do flawonoidów i jest pochodną kwercetyny wyizolowaną z nadziemnych części soczewicy jadalnej (*Lens culinaris*) odmiany *Tina.* Zainteresowanie tym związkiem wynika z faktu, że jest to nowo wyizolowany związek i do tej pory jest bardzo mało danych literaturowych na temat metabolitów wyizolowanych z liści i łodyg tej rośliny.

Dlatego głównym celem podjętych badań było poznanie zdolności lenzozydu Aβ do wchodzenia w interakcje z modelowymi błonami sporządzonymi z dipalmitylofosfatydylocholiny (DPPC), określenie sposobu oddziaływania tego związku na membrany poprzez ocenę jego wpływu na właściwości dynamiczne i strukturalne dwuwarstwy lipidowej, a także poznanie lokalizacji i orientacji flawonoidu w błonach.

Kolejnym celem było sprawdzenie oddziaływania związku z lipidowymi i białkowymi składnikami komórek linii prawidłowych i nowotworowych. Do badań użyto dwóch linii nowotworowych takich jak rak szyjki macicy (HeLa) i rak krtani (Hep-2) oraz linii prawidłowej, którą stanowiły fibroblasty skóry człowieka (HSF).

Aby ocenić skutki inkorporacji LAβ do błon na komórki wyznaczono następujące cele cząstkowe:

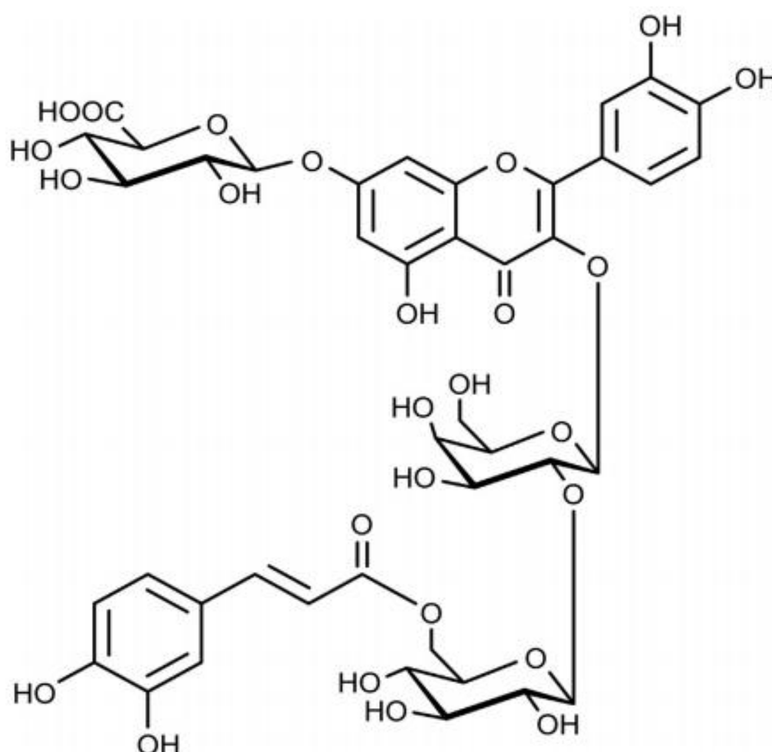
1. Analizę zmian w morfologii i ultrastrukturze komórek z wyżej wymienionych linii komórkowych poddanych działaniu flawonoidu.

2. Sprawdzenie wpływu badanego związku na parametry morfometryczne takie jak: średnica, obwód, długość, szerokość oraz pole powierzchni komórek oraz jąder komórkowych.
3. Ocenę wpływu lenzozydu Aβ na indukcję apoptozy, nekrozy i stresu oksydacyjnego.
4. Określenie cytotoksyczności flawonoidu w stosunku do komórek prawidłowych i nowotworowych.
5. Zbadanie działania badanego związku na kanały potasowe błon.

III. Materiały i metody

3.1. Badany związek

W badaniach stosowano lenzozyd Aβ (kwerectyna-3-O-[6-O-E-kofeilo)-β-D-glukopiranozylo(1→2)]-β-D-galaktopiranozylo-7-O-β-D-glukuropiranozyd) – pochodną kwercetyny wyizolowaną z nadziemnych części soczewicy jadalnej odmiany *Tina*. Flawonoid ten w swojej strukturze oprócz dwóch pierścieni aromatycznych połączonych pierścieniem piranu zawiera trzy reszty cukrowe oraz kwas kawowy (Ryc. 16). Liofilizat związku w postaci żółtego proszku był rozpuszczany w etanolu (POCH) lub w sulfotlenku dimetylu (DMSO) (Sigma - Aldrich). Roztwór lenzozydu Aβ przechowywano w ciemności.



Ryc. 16. Wzór lenzozydu Aβ [Żuchowski i in., 2014].

3.2. Odczynniki

- **Podłoża hodowlane i dodatki do podłóż:**

  - podłoże hodowlane Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM - Sigma-Aldrich

  - podłoże hodowlane RPMI 1640 – Sigma-Aldrich

  - 0,25% roztwór trypsyny z dodatkiem 0,53 mM EDTA – Sigma- Aldrich

  - bydlęca surowica płodowa (FBS) – Gibco

  - antybiotyki: penicyliny 100 U/ml, streptomycyny 100 U/ml, amfoterycyny B, 0,25 μg/ml (Sigma)

- **Bufory:**

  - bufor PBS bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} - Biomed

  - bufor PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} - Biomed

  - bufor HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) - Sigma-Aldrich

  - 0,1 M bufor kakodylanowy do płukania pH 7,2

  - bufor kakodylanowy do utrwalaczy (z dodatkiem 5 mM $CaCl_2$ i 2% sacharozy)

- **Zestawy komercyjne:**

  - LIVE/DEAD cell viability kit - Thermo Fisher Scientific

  - Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FTIC) apoptosis detection kit - BD Biosciences, BD Pharmingen™

- **Inne odczynniki:**

  Aceton - POCH

  Aldehyd glutarowy 25% - Polysciences Inc

  Azotan ołowiu - POCH

  Błękit toluidynowy - Sigma- Aldrich

  Chlorek magnezu $MgCl_2$ - POCH

  Chlorek potasu KCl - POCH

Chlorek sodu NaCl - POCH

Chlorek prazeodymu $PrCl_3$ - Sigma-Aldrich

Chlorek wapnia $CaCl_2$ - POCH

Chloroform - POCH

Czerwień obojętna - Sigma-Aldrich

Cytrynian sodu - POCH

Czterotlenek osmu - Sigma-Aldrich

Dihydrorodamina DHR 123 - Molecular Probes

Dipalmitylofosfatydylocholina (DPPC) – Sigma-Aldrich

Ditlenek deuteru (D_2O) - ARMAR Chemicals Co.

DMSO (dimetylosulfotlenek) - Sigma-Aldrich

Etanol 96% - POCH

Etanol bezwodny - POCH

Glukonian potasu - Sigma-Aldrich

Glukonian sodu - Sigma-Aldrich

Kakodylan sodu - Sigma-Aldrich

Kwas octowy - POCH

Octan uranylu - Polysciences Inc

Oranż akrydyny - Sigma-Aldrich

Hoechst 33342 - Sigma-Aldrich

Tricine - Sigma- Aldrich

Wodorotlenek sodu - POCH

Żywica LR White – Sigma-Aldrich

3.3. Materiał badawczy

3.3.1. Liposomy i ich preparatyka

3.3.1.1. Liposomy wielowarstwowe (ang. Multilamellar Vesicles, MLV) do pomiarów FTIR

Wielowarstwowe liposomy zostały sporządzone z dipalmitylofosfatydylocholiny (DPPC). Porcję DPPC zawierającą 2.72 x 10^{-2} M cząstek oraz 5 mol% lenzozydu Aβ rozpuszczonego w etanolu mieszano i odparowywano w strumieniu gazowego azotu oraz pod próżnią. Następnie wytrząsano energicznie z 200 µl wody destylowanej z 5 % dodatkiem D_2O w temperaturze nieco powyżej 41°C.

3.3.1.2. Liposomy wielowarstwowe (ang. Multilamellar Vesicles, MLV) do pomiarów ^{1}H NMR

Fosfosfolipidy (DPPC) i lenzozyd Aβ rozpuszczono w mieszaninie chloroformu i etanolu (1:1). Stężenie flawonoidu w próbce wynosiło 3.2 x1 0^{-4} M a lipidów 3.2 x 10^{-2} M. Następnie rozpuszczalniki odparowano w strumieniu gazowego azotu i pod próżnią. Nawodnione D_2O próbki energicznie wytrząsano przez 60 minut na wytrząsarce w temperaturze powyżej 41°C. W celu uzyskania jednorodnej mieszaniny zawiesinę lipidów poddano działaniu ultradźwięków (8 razy po 3 sekundy) w sonifikatorze (Sonics Vibra Cell^{TM} , USA) w temperaturze 4° C. Przed samym pomiarem dodano 4 mM $PrCl_3$.

3.3.1.3. Wielkie jednowarstwowe liposomy (ang. Giant Unilamellar Vesicles, GUV)

Do sporządzenia wielkich jednowarstwowych liposomów wykorzystano dipalmitylofosfatydylocholinę (DPPC). Stężenie lipidu wynosiło 20 mg/ml. W badaniach wykorzystano roztwór lenzozydu Aβ w etanolu, który dodawano do etanolowego roztworu lipidowego (w którym stężenie lipidu nie przekraczało 27 mM) w stężeniu 5 mol% w stosunku do DPPC. Następnie na wewnętrzne strony dwóch platynowych elektrod (35x4x0,5 mm) nałożono po 15 µl mieszaniny poprzez odparowanie w strumieniu gazowego azotu. Elektrody przez godzinę inkubowano pod próżnią w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika organicznego. Następnie elektrody pokryte warstwą lipidową umieszczono

w kuwecie zawierającej roztwór buforowy (1,4 ml, 20 mM Tricine, 10 mM KCl, pH 7,4). Elektroformację prowadzono przez 2 godziny przy wolnozmiennym napięciu (10 Hz) o wartości 2,1 V w temperaturze 50°C (powyżej temperatury przejścia fazowego dla DPPC).

3.3.2. Typy komórek i warunki hodowli

W doświadczeniach użyto linii komórkowych raka szyjki macicy człowieka (HeLa B ECACC Nr 85060701), raka krtani (Hep-2 ECACC Nr 86030501) oraz fibroblastów ludzkich skóry (linia komórkowa uzyskana z hodowli pierwotnej fragmentów skóry ludzkiej). Hodowle prowadzono w pożywce RPMI 1640 (linia HeLa i Hep-2) oraz DMEM (linia HSF) z dodatkiem 5% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) (v/v) oraz z dodatkiem antybiotyków. Do badań użyto: penicyliny - 100 U/ml, streptomycyny -100 U/ml, amfoterycyny B- 0,25 μg/ml. Komórki o gęstości 1 x 10^6 komórek/ml wysiewano do naczyń typu Falcon (5 ml) do obserwacji mikroskopowych oraz pomiarów FTIR. Następnie komórki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej 95% z dodatkiem 5% CO_2. Hodowle poddano działaniu lenzozydu Aβ w stężeniach 5, 10, 15, 25 i 50 μg/ml. Czas inkubacji wynosił 24 oraz 48 godzin. Końcowe stężenie DMSO w podłożu hodowlanym nie przekraczało 0,25%.

3.4. Metody

3.4.1. Spektroskopia FTIR modelowych błon lipidowych sporządzonych z DPPC

Do badań wykorzystano wielowarstwowe liposomy, które sporządzono według procedury opisanej w podpodrozdziale 3.3.1.1 Próbki po łagodnym wirowaniu, zostały umieszczone na krysztale ATR przez odparowanie wody destylowanej z dodatkiem D_2O (pH 7,4). Widma absorpcji w podczerwieni rejestrowano stosując spektrometr z transformatą Fouriera (ATR-FTIR) (Nicolet iS50R, Thermo Scientific, USA) [Pawlikowska-Pawlęga i in. 2014]. Podczas pomiarów próbki były przedmuchiwane argonem. Dla każdego pomiaru zbierano 10 skanów. Widma absorpcji zbierano w obszarze pomiędzy 4000 a 400 cm^{-1} z uwzględnieniem jednego punktu pomiarowego co 2 cm^{-1}.

Doświadczenia przeprowadzono w temperaturze 21°C. Analizy spektralne przeprowadzono z użyciem oprogramowania Grams Al z ThermoGalactic (USA).

3.4.2. Absorpcyjna spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) komórek wybranych linii komórkowych

Komórki inkubowano odpowiednio przez 24 i 48 godzin w temperaturze 37°C bez obecności lenzozydu Aβ (kontrola), a także w obecności 15 µg/ml lenzozydu Aβ. Następnie podłoże usuwano a monowarstwę komórek przemywano kilkukrotnie PBS-em. Komórki zostały delikatnie zeskrobane za pomocą skrobaków komórkowych i zawieszone w buforze fosforanowym z 5% dodatkiem wody ciężkiej (D_2O). Próbki po łagodnym wirowaniu, zostały umieszczone na krysztale ATR przez odparowanie buforu PBS z dodatkiem D_2O (pH 7,4). Widma absorpcji w podczerwieni komórek rejestrowano stosując spektrometr z transformatą Fouriera (ATR-FTIR) [Pawlikowska-Pawlęga i in. 2014]. Podczas pomiarów próbki były przedmuchiwane argonem. Widma rejestrowano za pomocą spektrometru Nicolet iS50R (Thermo Scientific, USA). Zbierano 10 skanów dla każdego pomiaru. Widma absorpcji zbierano co jeden punkt pomiarowy czyli co 2 cm^{-1}, w obszarze pomiędzy 4000 a 400 cm^{-1}. Jak tło stosowano czysty kryształ. Doświadczenia były przeprowadzone w temperaturze 21°C. Analizy spektralne wykonano z użyciem oprogramowania Grams Al z ThermoGalactic (USA).

3.4.3. Jądrowy rezonans magnetyczny (^1H NMR) błon lipidowych sporządzonych z DPPC

Liposomy wielowarstwowe do doświadczenia przygotowano według procedury opisanej w podpodrozdziale 3.3.1.2. Mieszaninę DPPC i LAβ przelano do specjalnych probówek NMR o średnicy 5 mm. Widma zostały zarejestrowane przy pomocy spektrometru NMR Brucker Avance 300 (Niemcy). Pomiar wykonywano w temperaturze 60°C w pulsacyjnym gradiencie pola. Szerokość okna spektralnego wynosiła 4496 Hz, a rozdzielczość cyfrowa 0,137 Hz. Szerokość impulsu była równa 0,6 µs, natomiast czas akwizycji i opóźnienia wynosił odpowiednio 3,64 s i 1s.

3.4.4. Mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) wielkich jednowarstwowych liposomów z wbudowanym lenzozydem Aβ

W doświadczeniach wykorzystano wielkie jednowarstwowe liposomy przygotowane metoda elektroformacji (podrozdział 3.3.1.3). Do badań użyto mikroskopu optycznego OLYMPUS IX71 (OLYMPUS, Japonia) połączonego z systemem konfokalnym MicroTime 200 (PicoQuant, GmbH, Niemcy). Za pomocą półprzewodnikowego lasera impulsowego generowano wiązkę wzbudzającą o długości fali 405 nm. Do zogniskowania wiązki laserowej na próbce wykorzystano obiektyw immersyjny (OLYMPUS, Japonia) o aperturze numerycznej równej 1,2. Na drodze wiązki wzbudzającej wstawiono przesłonę o średnicy 50 μm, który umożliwiała wybranie pojedynczej płaszczyzny ogniskowej oraz filtr interferencyjny ZT 405RCD (Semrock, USA) zapewniający monochromatyczność światła wzbudzającego. Aby zapobiec rejestracji kwantów rozproszonych na drodze wiązki emisyjnej (przed detektorem) wstawiono filtr pasmowy HQ 430lp. Za pomocą diody lawinowej (APD) połączonej z układem HydraHarp400 (PicoQuant, Niemcy) skorelowanym w czasie zliczania pojedynczych fotonów (TCSPC, ang. Time 64 Correlated Single Photon Counting) rejestrowano fotony fluorescencyjne. Dane analizowano przy użyciu pakietu oprogramowania SymPhoTime 64 (PicoQuant, Niemcy). W pomiarach anizotropii dwie składowe polaryzacji emisji fluorescencji zostały rozdzielone za pomocą modułu polaryzacyjnego (ang. polarizing cube) i skierowane na dwa detektory, przed którymi ustawiono filtry polaryzacyjne, oczyszczające dodatkowo wiązkę docierającą do detektora. Anizotropia fluorescencji została określona na podstawie poniższego wzoru i wartości fluorescencji prostopadłej ($F^{\perp}$) i równoległej ($F\|$) do kierunku polaryzacji wiązki wzbudzającej:

$$r = (F\| - GF^{\perp})/(F\| + 2GF^{\perp}) \quad (1)$$

Przed pomiarem określono instrumentalny współczynnik korygujący (G). Współczynnik G jest stosunkiem czułości detektorów na światło spolaryzowane w kierunku prostopadłym i równoległym do kierunku polaryzacji wiązki wzbudzającej.

Dzięki użytemu systemowi jednocześnie rejestrowano anizotropię i czas życia fluorescencji próbek. Intensywność zaniku fluorescencji analizowano w kategoriach modelu wykładniczego stosując oprogramowanie SymPhoTime 64 v. 2.1 (PicoQuant, Niemcy).

Na podstawie zależności:

$$\frac{F_Z}{F_Y} = \frac{1}{2}\tan^2 v$$

obliczono średni kąt orientacji pomiędzy kierunkiem przejścia dipolowego cząsteczek wbudowanych w dwuwarstwę lipidową a osią normalną do płaszczyzny błony (v). W badaniach analizowano 20 liposomów GUV.

3.4.5. Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) wielkich jednowarstwowych liposomów (GUV)

W badaniach kalorymetrycznych stosowano wielkie jednowarstwowe liposomy DPPC otrzymane metodą elektroformacji lipidu z buforem (podrozdział 3.1.3). DPPC rozpuszczono w etanolu. Utworzone liposomy wirowano za pomocą wirówki I Fuge M12P Neuation (EQLAB, Polska) z prędkością 7000 obr./min przez 3 minuty. Próbki przed wstrzyknięciem do kalorymetru odgazowano. Do pomiarów kalorymetrycznych pobrano 220 µl zawiesiny zwirowanych liposomów.

Do badań stosowano różnicowany skaningowy kalorymetr MicroCal VP-Capillary DSC firmy GE Healthcare (USA). Dolne frakcje zawiesiny liposomów zebrane po wirowaniu (wraz z osadem) wstrzykiwano do komórki kalorymetru przeznaczonej na próbkę badaną. Do drugiej komórki (referencyjnej) wstrzykiwano taką samą objętość buforu. Pomiary wykonywano przy ciśnieniu 0,28 MPa, prędkości skanowania temperatur (70°/godz.) w temperaturach od 35 °C do 50 °C. W celu otrzymania linii odniesienia przeprowadzono pomiar, gdzie do obu komórek nastrzykiwano bufor. Od termogramów otrzymanych dla badanych próbek odejmowano termogram buforu w celu otrzymania krzywej samej próbki. Do analizy krzywych DSC wykorzystano program VPViewer2000.

3.4.6. Pomiary patch-clamp fibroblastów skóry człowieka (HSF)

Technika patch- clamp umożliwi badanie strumieni jonów przepływających przez pojedyncze kanały w błonach komórkowych. Aktywność kanałów potasowych rejestrowano w konfiguracji inside-out stosując gradient jonów K^+ i Na^+. Do pomiarów użyto dwóch

roztworów. W komorze znajdował się roztwór o pH 7,3 zawierający 140 mM glukonianu sodu, 4 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM Hep natomiast wewnątrz mikropipety znajdował się roztwór zawierający 140 mM glukonianu potasu, 4 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$ o pH 7,3. Pomiary wykonywano na łatkach z ludzkich komórek fibroblastów skóry w konfiguracji inside-out. Aby wykluczyć aktywność kanałów chlorkowych użyto anionu glukonianu. Pipety pomiarowe zostały wykonane z borokrzemianowych kapilar o średnicy 2 µm. Pomiary prądów jonowych zostały wykonane przy użyciu rejestratora Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments). Dane zostały przefiltrowane przy użyciu 10 kHz filtra dolnoprzepustowego oraz zdigitalizowane przy częstotliwości próbkowania wynoszącej 20 kHz za pomocą oprogramowania Clampex 7 Software (Axon Instruments).

3.4.7. Test żywotności komórek metodą czerwieni obojętnej (NR)

Metoda pobierania czerwieni obojętnej (ang. Neutral Red Uptake Assay) przez lizosomy żywych komórek, polega na ocenie integralności błony komórkowej. Czerwień obojętna w komórkach z prawidłową błoną komórkową jest zatrzymywana wewnątrz komórki, podczas gdy w komórkach z uszkodzoną błoną barwnik ten jest uwalniany do roztworu. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do ilości barwnika wychwyconego przez lizosomy żywych komórek. Pomiar spektrofotometryczny dotyczy ilości barwnika, który pozostaje w komórkach, w związku z czym pozwala na ocenę ilości żywych komórek z nieuszkodzoną błoną cytoplazmatyczną [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2014].

Doświadczenie przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych. Do hodowli o gęstości 1×10^5 komórek/ml, po zlaniu podłoża hodowlanego, dodawano po 100 µl odpowiednich rozcieńczeń lenzozydu Aβ w płynie hodowlanym z 2% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej. Po 24 i 48 godzinach inkubacji w warunkach standardowych, usuwano płyn hodowlany. Do wszystkich dołków dodawano po 100 µl odczynnika NR (rozpuszczonego dzień przed użyciem w medium hodowlanym do stężenia 40 µg/ml, przed użyciem odwirowanego przy 1500 obr./min. przez 5 minut, w celu usunięcia powstałych kryształów). Po 3 godzinach inkubacji w warunkach standardowych usuwano NR z płytki i przepłukiwano każdy dołek roztworem utrwalacza (200 µl) (0,5% roztwór formaliny w 1% $CaCl_2$). Po 2 minutach usuwano utrwalacz, a do dołków dodawano po 100 µl roztworu

rozpuszczalnika (1% lodowaty kwas octowy w 50% etanolu) i ekstrahowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie oznaczono spektrofotometrycznie absorbancję przy długości fali λ=550 nm używając czytnika płytek firmy Molecular Devices. Każdą analiza była wykonana w trzech powtórzeniach. Aby określić różnice statystyczne między grupami zastosowano test t-Studenta, gdzie wartości $p < 0{,}05$ uznano za istotne statystycznie.

3.4.8. Test żywotności komórek LIVE/DEAD

Podstawą testu jest różna przepuszczalność żywych i martwych komórek w stosunku do mieszaniny dwóch barwników fluorescencyjnych: SYTO 10 i DEAD Red. SYTO 10 jest barwnikiem zielonej fluorescencji i wybarwia komórki żywe czyli z nienaruszoną błoną komórkową. DEAD red jest barwnikiem czerwonej fluorescencji i wybarwia tylko komórki z uszkodzoną błoną [Mitchell i in., 1998]. Do sporządzenia mieszaniny barwiącej użyto po 2 µl barwnika SYTO 10 i barwnika DEAD red, które rozpuszczono w 1 ml buforu HBSS.

Komórki były inkubowane z badany związkiem w stężeniu 5, 10, 15, 25 i 50 µg/ml przez 24 i 48 godzin. Po tym czasie komórki przepłukano buforem HBSS. Po zlaniu buforu dodano 250 µl roztworu mieszaniny barwników i komórki inkubowano przez 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Następnie komórki przepłukano buforem HBSS a później utrwalano przez godzinę w 4 % roztworze aldehydu glutarowego w buforze HBSS. Komórki ponownie przepłukano świeżym buforem HBSS. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Labophot 2 przy długości fali 490 nm. Analizie poddano 1000 komórek z losowo wybranych miejsc. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach. W celu określenia różnic statystycznych między grupami zastosowano test t-Studenta, gdzie wartości $p < 0{,}05$ uznano za istotne statystycznie.

3.4.9. Barwienie komórek jodkiem propidionowym i Hoechstem 33342

Metoda ta umożliwia identyfikację komórek apoptotycznych i nekrotycznych na podstawie fluorescencji barwników wiążących się z DNA. W oznaczeniu wykorzystano dwa barwniki: jodek propidionowy, który jest barwnikiem różowej fluorescencji martwych komórek i nieselektywnie łączy się do dwuniciowego DNA (dsDNA) co 4-5 par zasad oraz Hoechst 33342 będący barwnikiem niebieskiej fluorescencji, który przenika zarówno do

komórek żywych jak i apoptotycznych i wbudowuje się do dsDNA w miejscach bogatych w adeninę i tyminę [Jankowska i in., 1997]. Do sporządzenia mieszaniny barwiącej użyto:

- jodek propidionowy - 300 µl (stężenie wyjściowe 0,5 mg/ml)
- Hoechst 33342 - 200 µl (stężenie wyjściowe 0,4 mg/ml)
- woda destylowana - 500 µl

Odpowiednio przygotowaną mieszaninę barwników dodawano w objętości 2,5 µl na 1 ml pożywki zawierającej komórki. Następnie inkubowano je w ciemności przez 5 minut w temperaturze 37°C. Po tym czasie dokonano analizy komórek pod mikroskopem fluorescencyjnym Nikon Labophot 2 przy długości fali 420 nm. W obrazie mikroskopowym analizowano ilość komórek apoptotycznych, nekrotycznych oraz prawidłowych. Jodek propidionowy powodował różowe zabarwienie komórek nekrotycznych, natomiast barwnik Hoechst 33342 wybarwiał jądra komórek prawidłowych na niebiesko, jednocześnie powodując jasnoniebieskie świecenie komórek apoptotycznych. Do określenia różnic statystycznych między grupami zastosowano test t-Studenta, gdzie wartości $p < 0{,}05$ uznano za istotne statystycznie. Do obliczeń brano pod uwagę 1000 komórek z losowo wybranych miejsc. Każdą analizę wykonano w trzech powtórzeniach.

3.4.10. Analiza komórek cytometrem przepływowym

Jedną ze zmian zachodzących w komórce podczas procesu apoptozy jest przemieszczenie fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy fosfolipidowej błony komórkowej. Aneksyna V swoiście wiąże się z fosfatydyloseryną i pozwala na jej wykrycie w błonie komórkowej. Zastosowanie jednoczesnego barwienia aneksyną V sprzężoną z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) i jodkiem propidyny (PI) pozwala na wykrycie komórek z uszkodzoną błoną komórkową [Bartnik i in., 2016].

Komórki inkubowano z badanym związkiem w stężeniach 5, 10, 15, 25 i 50 ug/ml przez 24 i 48 godzin i wykonano cytometryczną analizę komórek apoptotycznych i nekrotycznych z wykorzystaniem testu aneksyny V- FITC/ PI. W tym celu komórki płukano buforem PBS bez jonów Ca^{2+}/Mg^{2+}, a następnie inkubowano z roztworem trypsyny w EDTA przez 3 minuty. Po odklejeniu komórek, do płytek hodowlanych dodawano płyn hodowlany

wzbogacony 10% surowicą w celu inaktywacji trypsyny. Następnie, komórki zbierano do probówek pomiarowych o pojemności 15 ml i wirowano (1000 obr./min) przez 5 minut. Po dwukrotnym przepłukaniu komórek PBS (bez jonów Ca^{2+}/Mg^{2+}) i zwirowaniu, zawieszano je w buforze wiążącym. Do probówek pomiarowych zawierających po 100 µl zawiesiny komórkowej dodawano po 5 µl roztworu Aneksyny V i 10 µl roztworu PI. W dalszym etapie komórki inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po czym, do każdej probówki dodawano po 400 µl buforu wiążącego. W przeciągu 1 godziny od zakończenia procesu barwienia przeprowadzano analizę żywych i martwych komórek przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur. Fluorescencję barwników mierzono w kanałach FL1- i FL-3.

Metoda ta pozwala wykryć 4 populacje komórek:

- nie wiążące aneksyny i nie wiążące PI (An-/PI-) czyli komórki żywe
- wiążące aneksynę i nie wiążące PI (An+/PI-), komórki wczesnoapoptotyczne
- wiążące aneksynę i wiążące PI (An+/PI+), komórki późnoapoptotyczne
- nie wiążące aneksyny i wiążące PI (An-/PI+), komórki nekrotyczne

3.4.11. Pomiary parametrów morfometrycznych komórek wybranych linii komórkowych

Komórki użyte do badań były inkubowane z lenzozydem Aβ w stężeniu 15 µg/ml przez 24 godziny. Komórki delikatnie zeskrobywano przy użyciu skrobaka do komórek, a następnie utrwalano w 4% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylanowym przez 2 godziny i 1% czterotlenku osmu przez następne 2 godziny. Procedurę przeprowadzono w temperaturze 4°C. Następnie komórki były odwadniane w szeregu alkoholów i acetonów a w dalszej kolejności zatapiane w żywicy LR White. Półcienkie skrawki pocięto nożem diamentowym na mikrotomie RMC MT - XL (Tucson, Arizona, USA). Następnie skrawki zabarwiano 1% błękitem toluidynowym i analizowano pod mikroskopem świetlnym Olympus BX40 wyposażonym w aparat cyfrowy Soft Imaging System (SIS) Color View III. Analizę morfometryczną przeprowadzono przy 40-krotnym powiększeniu. W analizie uwzględniano długość, szerokość, pole powierzchni, obwód oraz średnice komórek. Analizowano 1000 komórek z 20 różnych miejsc. Różnice statystyczne

między grupami określono za pomocą testu t-Studenta, gdzie wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

3.4.12. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Komórki nowotworowe linii HeLa i Hep-2 oraz komórki prawidłowe (linia HSF) były inkubowane z lenzozydem Aβ w stężeniach 5, 10, 15, 25 i 50 μg/ml przez 24 i 48 godzin. Następnie zlewano pożywkę i płukano komórki buforem PBS. Komórki utrwalano w 4% aldehydzie glutarowym w 100 mM buforze kakodylanowym przez 1 godzinę i 1% czterotlenku osmu przez następne 1,5 godziny. Procedurę przeprowadzono w temperaturze 4°C. Następnie komórki odwadniano w rosnącym szeregu stężeń roztworów acetonu (30-100%) w temperaturze pokojowej, suszono w punkcie krytycznym oraz napylono złotem w napylarce Emitech K550X. Próbki obserwowano przy użyciu mikroskopu TESCAN Vega 3 LMU (Czechy).

3.4.13. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Do zbadania ultrastruktury komórek zastosowano transmisyjny mikroskop elektronowy. Komórki (linii HeLa, Hep-2, HSF), po zlaniu podłoża hodowlanego, przemywano buforem PBS i utrwalano przez 2 godziny w 4 % roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,4. Po tym czasie, zlano roztwór utrwalacza i przepłukano komórki 0,1 M buforem kakodylanowym. Następnie komórki utrwalano przez 1,5 godziny w 1 % roztworze czterotlenku osmu w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,4 i ponownie płukano 0,1 M buforem kakodylanowym. Procedurę prowadzono w temperaturze 4 ºC. Kolejnym etapem było odwodnienie komórek w rosnącym szeregu acetonu (30 -100%) w temperaturze pokojowej. Tak przygotowane komórki przesycano mieszankami acetonu i żywicy LR White (odpowiednio w stosunku 3:1, 1:1, 1:3 acetonu do żywicy) przez 2 godziny każda, a następnie zatapiano w czystej żywicy (2x 3 godziny) i polimeryzowano w temperaturze 55 º C przez całą noc. Zatopiony materiał trymowano i cięto na ultracienkie skrawki o grubości 65-75 nm za pomocą mikrotomu RMC MT – XL (Tucson, Arizona, USA). Skrawki umieszczono na miedzianych siatkach a następnie kontrastowano przy użyciu octanu uranylu i odczynnika Reynoldsa

(podrozdział 4.13.1). Preparaty oglądano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym Zeiss EM 900 (Carl Zeiss, Niemcy).

3.4.13.1. Kontrastowanie preparatów do transmisyjnego mikroskopu elektronowego

Na szalce Petriego położono płytkę parafinową i naniesiono kilka kropli octanu uranylu. Następnie za pomocą pęsetki na kropli umieszczono siatkę miedzianą z preparatami (stroną lśniącą do kropli) i zamknięto szalkę. Preparaty inkubowano przez 15-20 minut. Po tym czasie odciągnięto octan uranylu przy użyciu bibułki i płukano siatki w wodzie redestylowanej wygotowanej do połowy objętości. Następnie siatki umieszczono w kropli odczynnika Reynoldsa (azotan ołowiu, cytrynian sodu, pH 12) na szalce z dodatkiem łusek NaOH (w celu wiązania nadmiaru CO_2). Siatki barwiono przez 13 minut a później odciągnięto odczynnik Reynoldsa i płukano w trzech zmianach wody redestylowanej. Siatki suszono na bibule w szalce Petriego.

3.4.16. Barwienie komórek dihydrorodaminą (DHR) 123

Barwienie dihydrorodaminą 123 pozwala na wykrycie stresu oksydacyjnego pojawiającego się w komórkach. Barwnik DHR 123 nie posiada ładunku dzięki czemu może biernie dyfundować w poprzek błony. W cytoplazmie komórki dihydrorodamina jest utleniana przez reaktywne formy tlenu (ROS) do kationowej rodaminy 123, która lokalizując się w mitochondriach daje zieloną fluorescencję [Viladevall i in., 2004].

Do hodowli komórkowych dodawano lenzozyd Aβ w stężeniach 5, 10, 15, 25 i 50 μg/ml i inkubowano przez 24 i 48 godzin. Następnie komórki przepłukiwano buforem PBS i zawieszano w buforze PBS o pH 7,4, po czym dodawano barwnik DHR 123 do uzyskania końcowego stężenia 0,5 μg/ml i inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Labophot 2 używając filtra B-2A. Do obliczeń brano pod uwagę 1000 komórek z losowo wybranych miejsc. Każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach. Do określenia różnic statystycznych między grupami zastosowano test t-Studenta, gdzie wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

IV. Wyniki

4.1. Interakcje lenzozydu Aβ z liposomami utworzonymi z dipalmitylofosfatydylocholiny (DPPC)

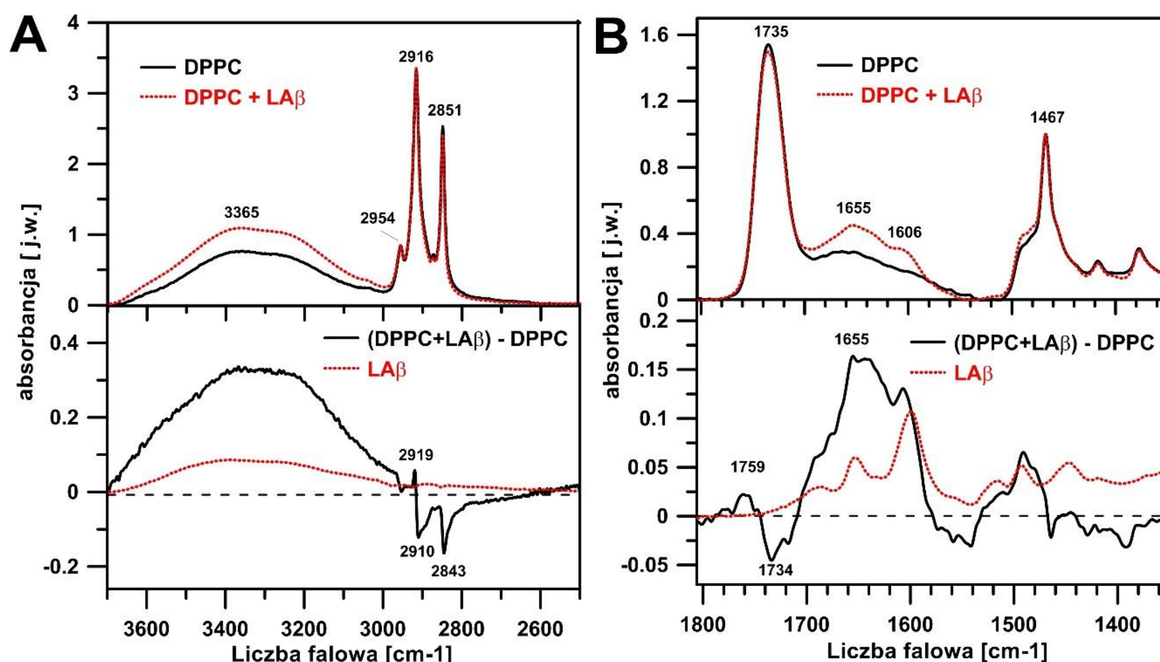
W badaniach zastosowano spektroskopię absorpcyjną w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), która jest czułą techniką umożliwiającą analizy oddziaływań molekularnych, między innymi w błonach lipidowych. Metoda ta umożliwia zbadanie wpływu dodatkowych składników na właściwości błony jak również wpływ samej błony na znajdujące się w niej cząsteczki. W widmach absorpcyjnych czystych liposomów naniesionych na kryształ ATR poprzez odparowanie buforu na bazie D_2O są widoczne pasma odpowiadające różnym drganiom. Obszar w zakresie 3500-3000 cm^{-1} jest charakterystyczny dla drgań rozciągających O–H. Region 2800-3000 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym (symetrycznym i antysymetrycznym) grup – CH_2 i – CH_3 , których maksima są przy 2916 cm^{-1} i 2849 cm^{-1}. Drgania rozciągające estrowych grup karbonylowych DPPC występują przy 1734 cm^{-1}. Pasmo przy 1468 cm^{-1} reprezentowane jest przez drgania nożycowe grup –CH_2, zaś pasmo 1378 cm^{-1} odpowiada drganiom parasolowym grup – CH_3. W obszarze grup polarnych fosfolipidów obecne są trzy główne pasma reprezentujące drgania antysymetryczne rozciągające grup – PO_2^- (1242 cm^{-1}), symetryczne rozciągające grup – PO_2^- (1090 cm^{-1}) częściowo nachodzące na pasmo reprezentujące drgania rozciągające ugrupowania C–O–P–O–C oraz pasmo odpowiadające drganiom antysymetrycznym rozciągającym grupy N^+– CH_3 (969 cm^{-1}). Tak więc, analiza widm FTIR umożliwia badania oddziaływania różnych cząsteczek z lipidami w błonie, w różnych jej rejonach.

Ryciny 17-18 przedstawiają widma absorpcji w podczerwieni czystych liposomów utworzonych z DPPC, liposomów z dodatkiem lenzozydu Aβ (LAβ) oraz widmo różnicowe. Widma były normalizowane przy maksimum pasma 1467 cm^{-1} charakterystycznego dla drgań nożycowych grup – CH_2.

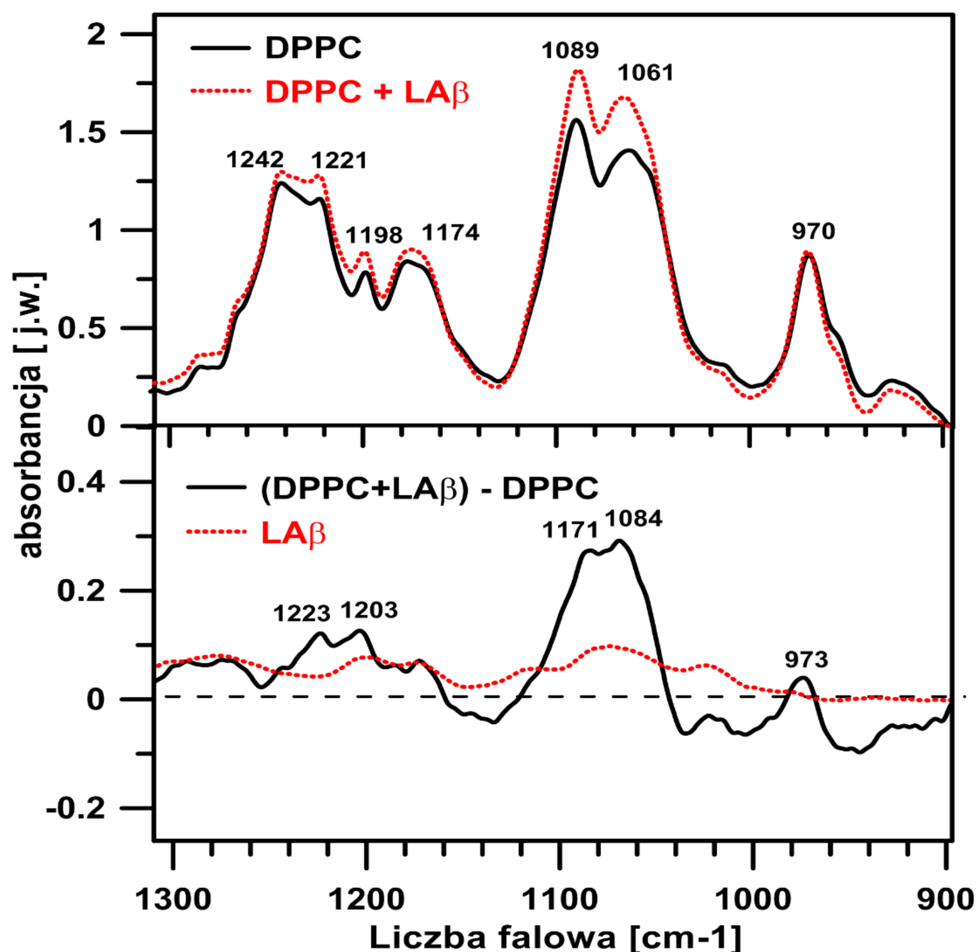
Wbudowanie badanego flawonoidu do modelowych błon lipidowych spowodowało wyraźne efekty w różnych regionach dwuwarstwy lipidowej. Analiza widm wykazała obecność szerokiego pasma z maksimum przy 3367 cm^{-1} o dużej intensywności charakterystycznego dla drgań rozciągających O–H (Ryc. 17 A). Pasmo to wskazuje na zwiększone przyłączanie cząsteczek wody przez próbki lipidu z dodatkiem flawonoidu za

pomocą wiązań wodorowych. Ujemne pasma w widmie różnicowym z maksimami przy 2910 i 2845 cm^{-1} odpowiadające drganiom rozciągającym (symetrycznym i antysymetrycznym) grup – CH_2 łańcuchów alkilowych zostały przesunięte w kierunku niższych liczb falowych, co potwierdza, niewielkie upłynniające działanie związku w stosunku do frakcji lipidowej (Ryc. 17 A). Najprawdopodobniej jest to związane z mniej zwartym ułożeniem cząsteczek lipidowych związanym z obecnością badanego związku. Jednocześnie w widmie różnicowym przedstawionym na rycinie 1 B możemy obserwować obecność ujemnego pasma z maksimum przy 1735 cm^{-1}. Obserwuje się również pasmo przesunięte w kierunku niższych częstości (1655 cm^{-1}) z dodatkowym ramieniem przy 1686 cm^{-1}, charakteryzujące się zwiększoną intensywnością (Ryc. 17 B). Jest to związane z przyłączaniem przez lenzozyd Aβ cząsteczek wody za pomocą wiązań wodorowych.

Znaczące i wyraźne zmiany, związane z obecnością badanego związku w modelowych błonach, wykazano w obszarze drgań symetrycznych rozciągających grup – PO_2^- (1090 cm^{-1}) oraz grupy C–O–P–O–C (1068 cm^{-1}) lipidu, gdzie nastąpił wzrost intensywności tych pasm (Ryc. 18). Wskazuje to wyraźnie na miejsce interakcji badanego związku oraz oddziaływanie pomiędzy głowami hydrofilowymi lipidu a badanym związkiem za pomocą wiązań wodorowych.



Ryc. 17. A - widma absorpcyjne z rejonu 3700-2500 cm^{-1}, B - widma absorpcyjne z rejonu 1800 – 1350 cm^{-1}. Widma absorpcyjne liposomów sporządzonych z czystego DPPC (linia ciągła), liposomów DPPC z dodatkiem lenzozydu Aβ (linia czerwona, przerywana), czystego lenzozydu Aβ (wykres na dole, czerwona, przerywana linia) oraz widmo różnicowe (wykres na dole, linia ciągła).



Ryc. 18. Widma FTIR liposomów w przedziale 1300-900 cm-1 uformowanych z DPPC (linia ciągła), liposomów DPPC z dodatkiem lenzozydu Aβ (linia przerywana), czystego lenzozydu Aβ (LAβ) (wykres na dole, linia przerywana) oraz widmo różnicowe (wykres na dole, linia ciągła).

4.2. Interakcje lenzozydu Aβ z lipidami i białkami komórek z hodowli *in vitro*

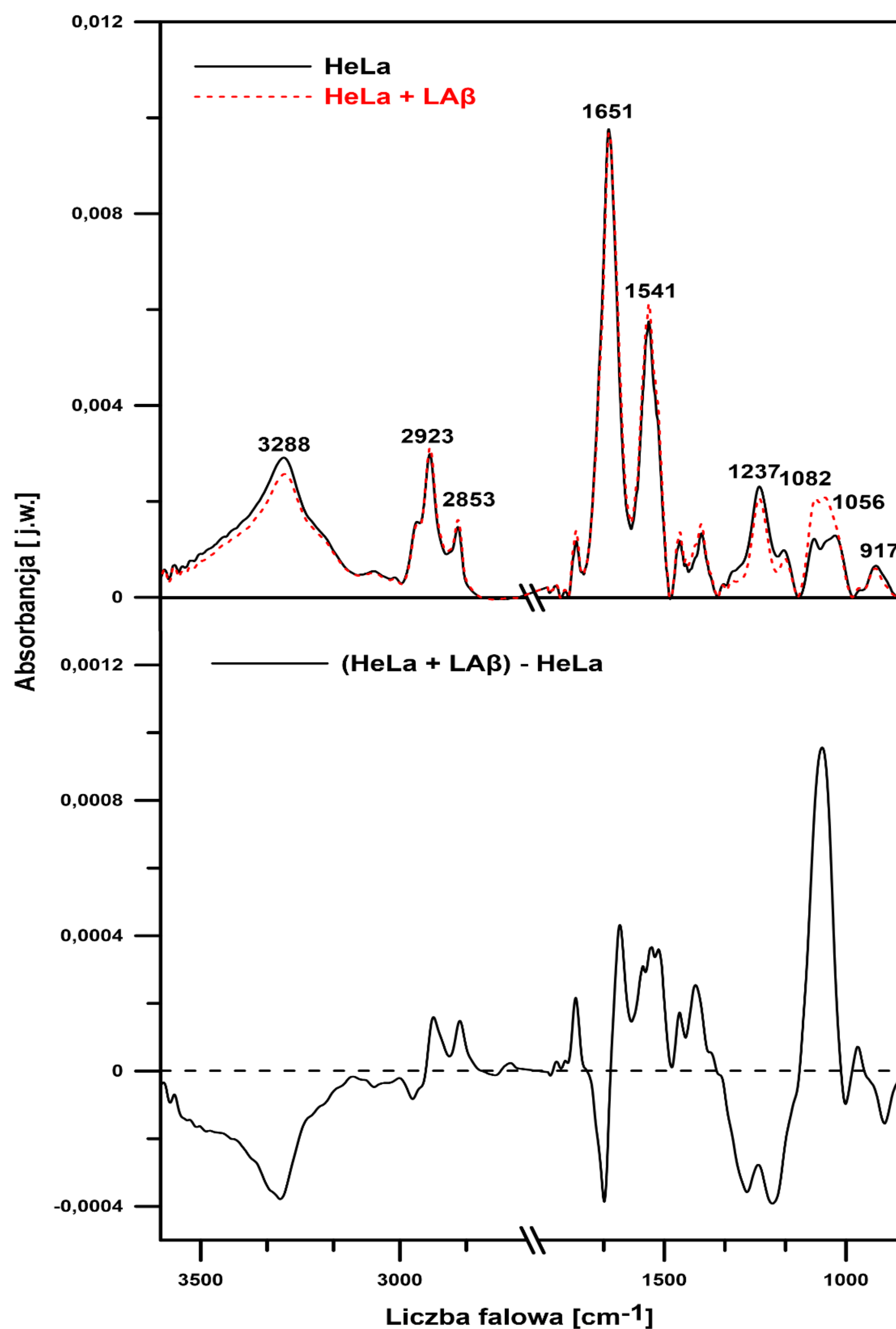
Odziaływanie lenzozydu Aβ na komórki z linii HeLa, Hep-2 i HSF badano na poziomie molekularnym techniką absorpcyjnej spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR). Komórki były inkubowane z lenzozydem w stężeniu 15 µg/ml przez 24 i 48 godzin.

4.2.1. Interakcje lenzozydu Aβ z lipidami i białkami komórek z linii HeLa po 24 godzinach inkubacji

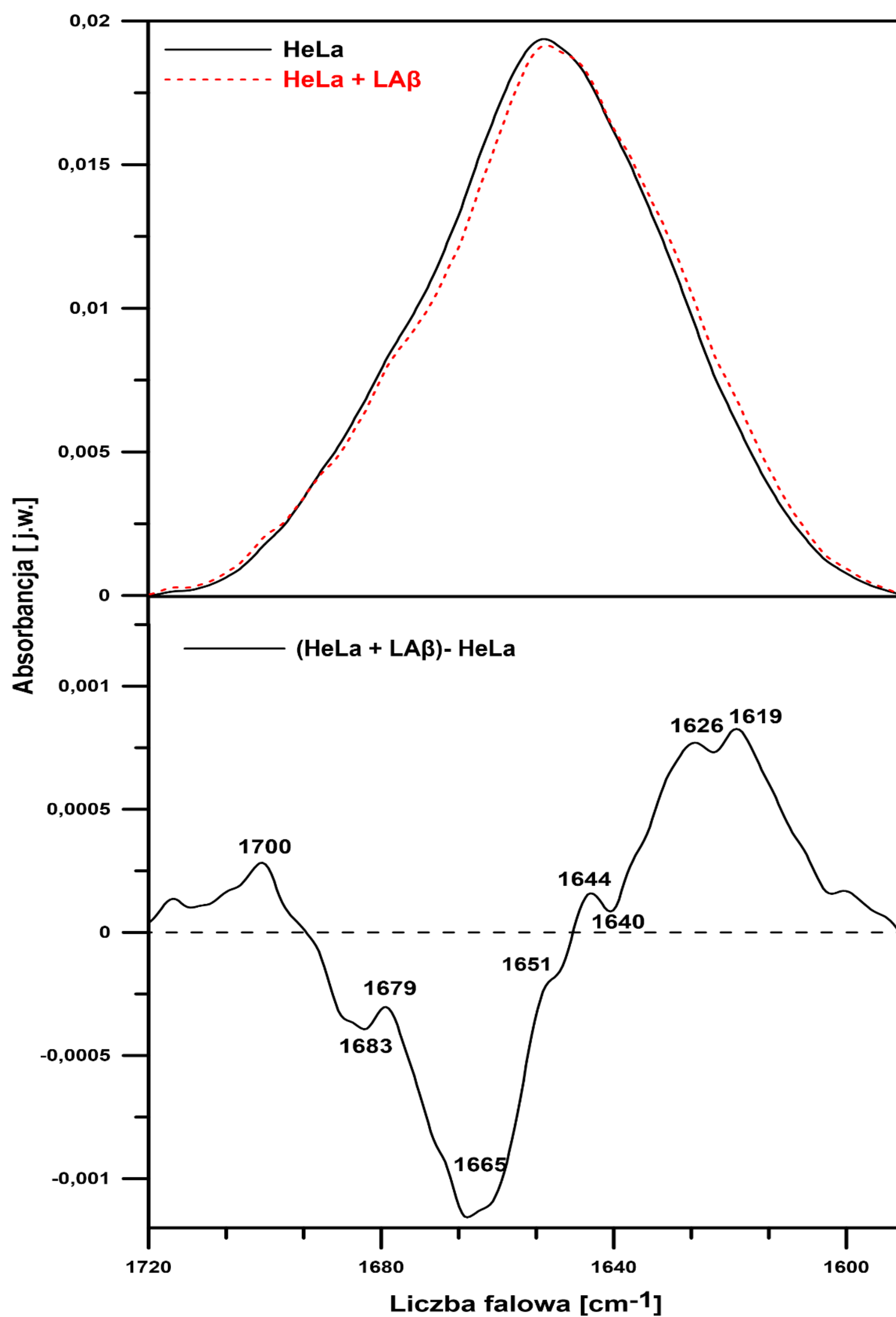
Rycina 19 przedstawia widma absorpcyjne w podczerwieni komórek kontrolnych raka szyjki macicy człowieka (HeLa) i inkubowanych z lenzozydem Aβ oraz widmo różnicowe. Widma były normalizowane polem z obszaru 2500 - 3800 cm^{-1} charakterystycznym dla

drgań rozciągających grup C-H (maksimum przy 2923 cm^{-1}) oraz drgań rozciągających grup O-H (maksimum przy 3288 cm^{-1}).

Analiza widm wykazała obecność szerokiego, ujemnego pasma z maksimum przy 3288 cm^{-1} o dużej intensywności charakterystycznego dla drgań rozciągających O–H. Wskazuje to, że flawonoid powoduje zmniejszone przyłączanie cząsteczek wody przez komórki za pomocą wiązań wodorowych. Ponadto, w rejonie odpowiadającym drganiom rozciągającym estrowych grup karbonylowych (1741 cm^{-1}) nastąpił wzrost intensywności. Dodanie związku spowodowało również silny efekt w rejonie lipidowym komórek (~ 900 - 1200 cm^{-1}).W obszarze głów polarnych fosfolipidów w pasmach odpowiadających drganiom rozciągającym grupy C-O-P-O-C (1056 cm^{-1}) oraz drganiom symetrycznym rozciągającym grup – PO_2^- (1082 cm^{-1}), nastąpił wzrost intensywności. Wskazuje to wyraźnie na oddziaływanie lenzozydu Aβ z głowami hydrofilowymi lipidów za pomocą wiązań wodorowych. Jednocześnie, lenzozyd Aβ spowodował obniżenie intensywności pasma z maksimum przy 1237 cm^{-1} charakterystycznego dla drgań antysymetrycznych rozciągających grup – PO_2^- , co wskazuje na przerwanie wiązań wodorowych w tym rejonie. Dodanie flawonoidu spowodowało łagodny efekt w rejonie amidu I (1600-1700 cm^{-1}) oraz amidu II (1510-1580 cm^{-1}) białek. Obecność ujemnego pasma w tym rejonie świadczy o obniżeniu ilości białka (Ryc. 19). Aby określić molekularną organizację białek poddano analizie rejon amidu I (Ryc. 20). Pasma w rejonie 1700-1600 cm^{-1} reprezentują różne struktury drugorzędowe białek takie jak: antyrównoległe β-kartki (1675-1695 cm^{-1}), α-helisy (1648-1660 cm^{-1}), β-kartki (1625-1640 cm^{-1}), struktury nieuporządkowane (1652-1660 cm^{-1}) oraz skręty (1660-1685 cm^{-1}) [Tamm, Tatulian 1997]. W regionie amidu I lenzozyd Aβ wyraźne zmniejszył ilość struktur typu skręty (1665 cm^{-1}). Jednocześnie obserwowano zwiększenie ilości struktur białkowych typu β-kartki (1626 cm^{-1}, 1619 cm^{-1}). Taki wynik potwierdza, że badany związek powoduje częściową agregację białek.



Ryc. 19. Widma absorpcyjne w podczerwieni komórek HeLa kontrolnych (czarna linia) i inkubowanych z lenzozydem Aβ (LAβ) (czerwona, przerywana linia) przez 24 godziny (wykres na górze) oraz widmo różnicowe (wykres na dole).



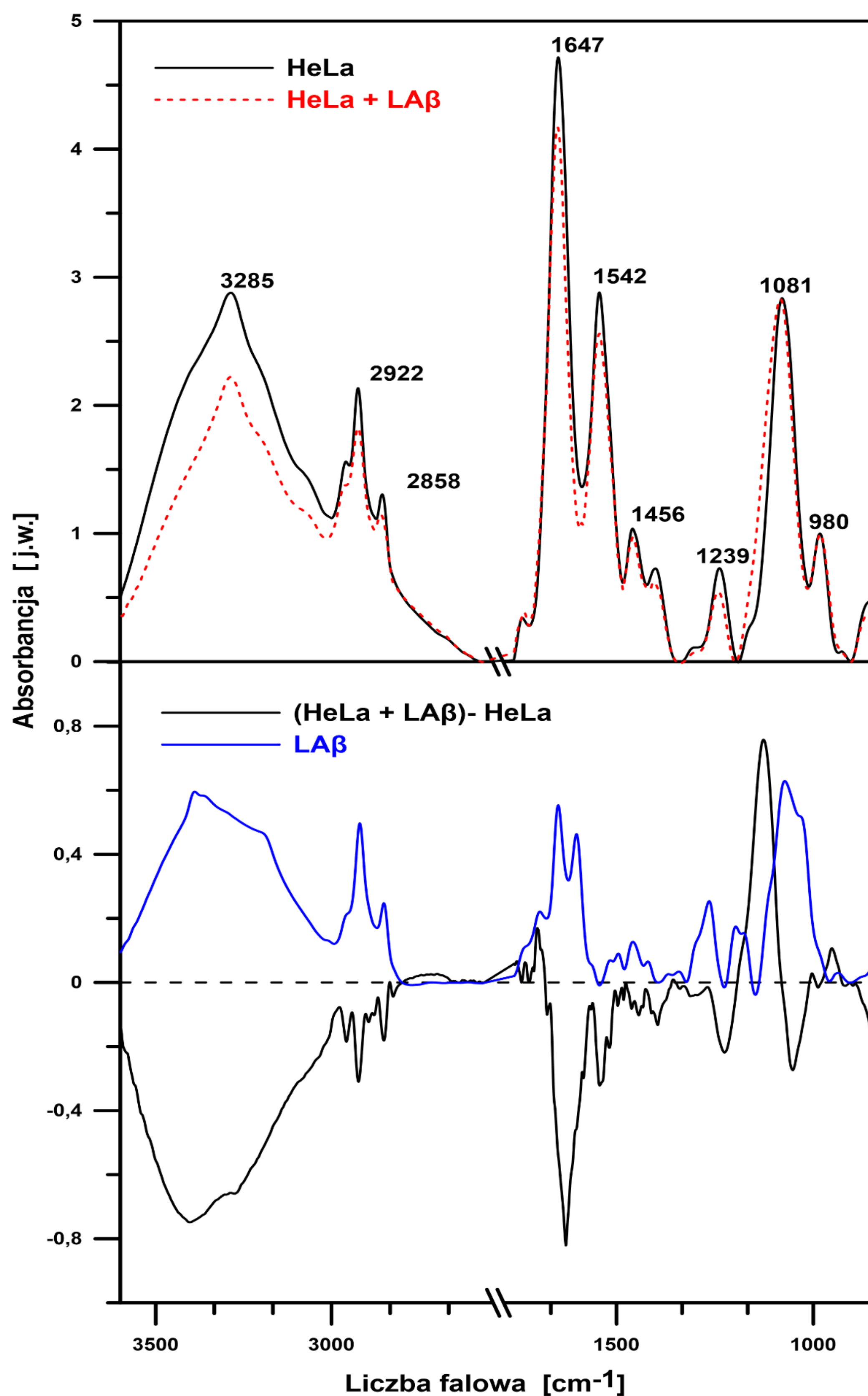
Ryc. 20. Widma absorpcyjne z regionu amidu I w komórkach linii HeLa (czarna linia) i inkubowanych z lenzozydem Aβ (LAβ) przez 24 godziny (czerwona, przerywana linia). Na dole widmo różnicowe.

4.2.2. Interakcje lenzozydu Aβ z lipidami i białkami komórek z linii HeLa po 48 godzinach inkubacji

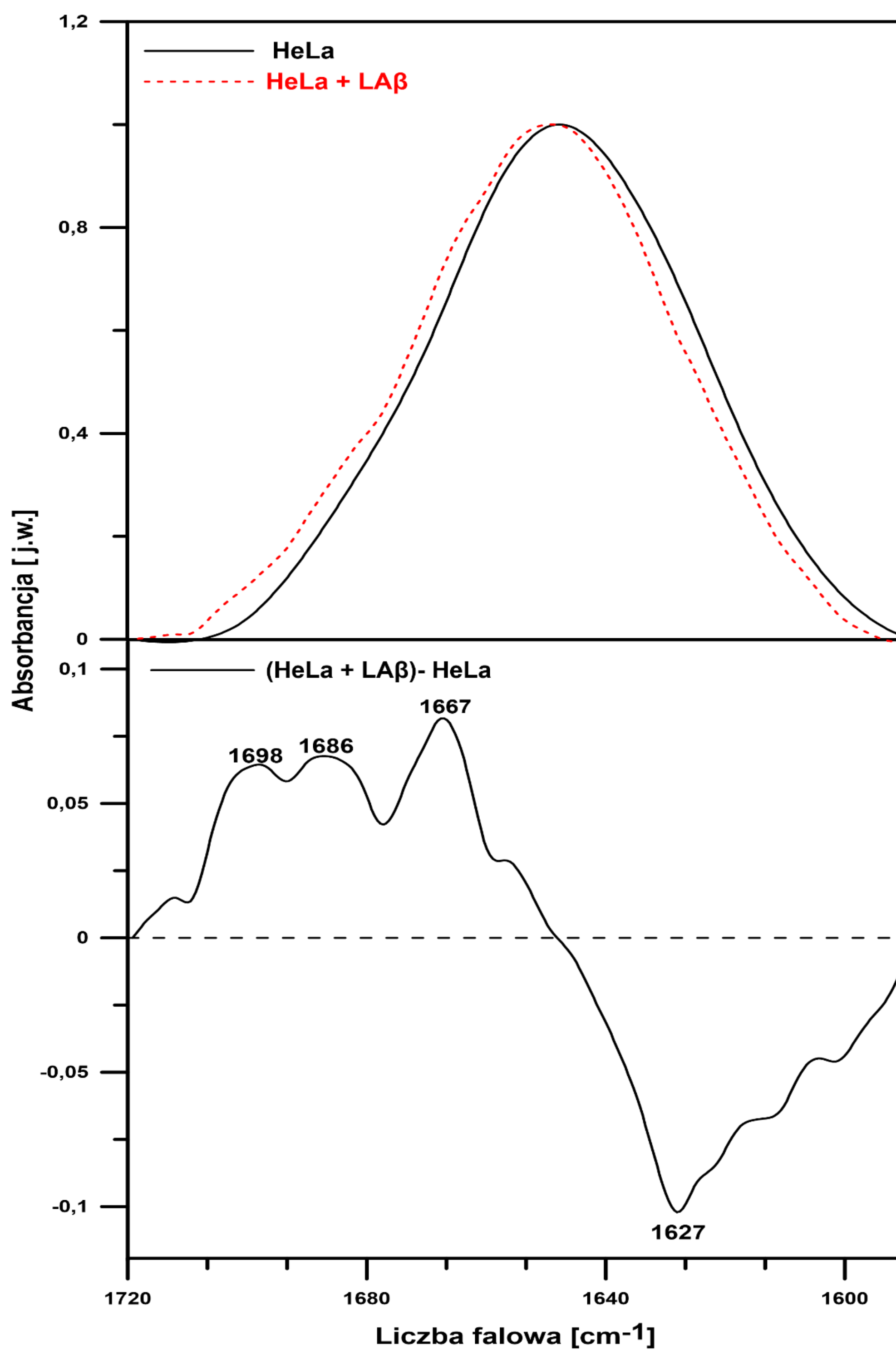
Widma FTIR komórek kontrolnych linii HeLa i inkubowanych z badanym związkiem przez 48 godzin oraz widmo różnicowe przedstawiono na rycinie 21. Widma zostały znormalizowane do jedynki przy maksimum pasma 980 cm^{-1} charakterystycznego dla antysymetrycznych rozciągających grupy N^{+}– CH_3.

Badania własne wykazały, że związek w niewielkim stopniu wpływał na lipidowe składniki komórek raka szyjki macicy (rejon ~ 900 -1200 cm^{-1}) inkubowanych przez 48 godzin, jednocześnie wywierając znaczący wpływ na ich składniki białkowe. Po dodaniu flawonoidu obserwowano obecność ujemnego pasma z maksimum przy 3285 cm^{-1} odpowiadającego drganiom rozciągającym grup O-H. Wskazuje to na, zmniejszone przyłączanie cząsteczek wody przez komórki za pomocą wiązań wodorowych. Niewielkie zmiany zaobserwowano w obszarze odpowiadającym drganiom rozciągającym grupy C-O-P-O-C (1081 cm^{-1}), gdzie nastąpiło przesunięcie pasma w kierunku wyższych częstotliwości. Może to sugerować pękanie wiązań wodorowych. Wyraźne zmiany odnotowano w rejonie amidu I (1600-1700 cm^{-1}) i amidu II (1510-1580 cm^{-1}). Ujemne pasmo w obszarze amidu I wskazuje na zmniejszenie stężenia białek po inkubacji z lenzozydem Aβ (Ryc. 21).

Analizując pasma regionu amidu I (Ryc. 22) zbadano molekularną organizację białek. W tym regionie lenzozyd Aβ zmniejszył ilość struktur typu β-kartki (1627 cm^{-1}). Jednocześnie zwiększył ilość nieuporządkowanych struktur białkowych (1667 cm^{-1}) jak również struktur typu pętle i skręty (1686 cm^{-1}). Uzyskane wyniki wskazują, że po dłuższym czasie inkubacji flawonoid hamuję syntezę białek oraz powoduje ich częściową denaturację.



Ryc. 21. Górny panel ryciny przedstawia widma FTIR komórek linii HeLa kontrolnych (czarna linia) i inkubowanych z lenzozydem Aβ (LAβ) (czerwona, przerywana linia) przez 48 godzin. Na dolnym panelu widoczne jest widmo samego flawonoidu oraz widmo różnicowe.

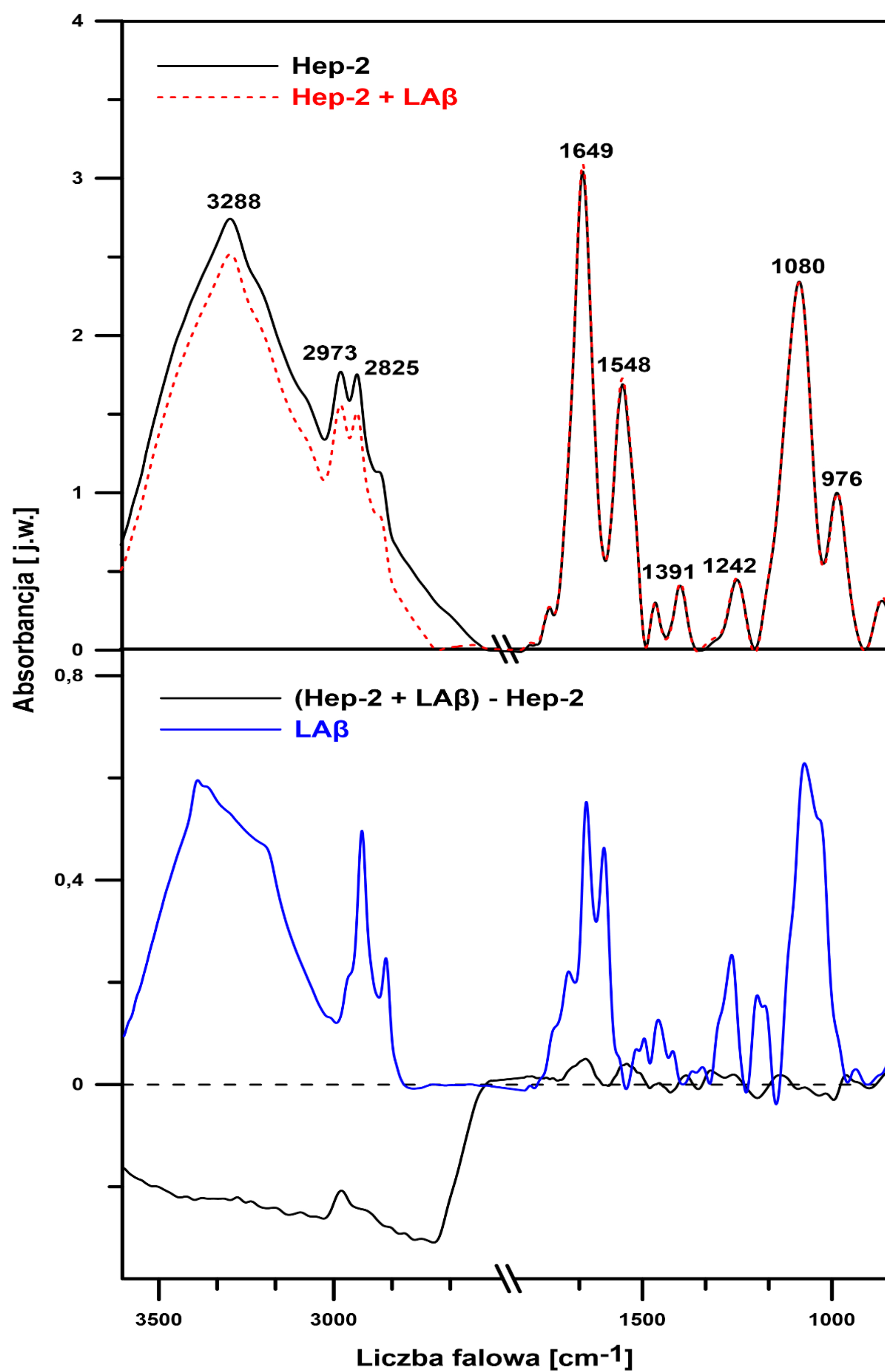


Ryc. 22. Region amidu I w komórkach kontrolnych linii HeLa (górny wykres, czarna linia) poddanych działaniu lenzozydu Aβ przez 48 godzin (górny wykres, przerywana linia). Dolny wykres przedstawia widmo różnicowe.

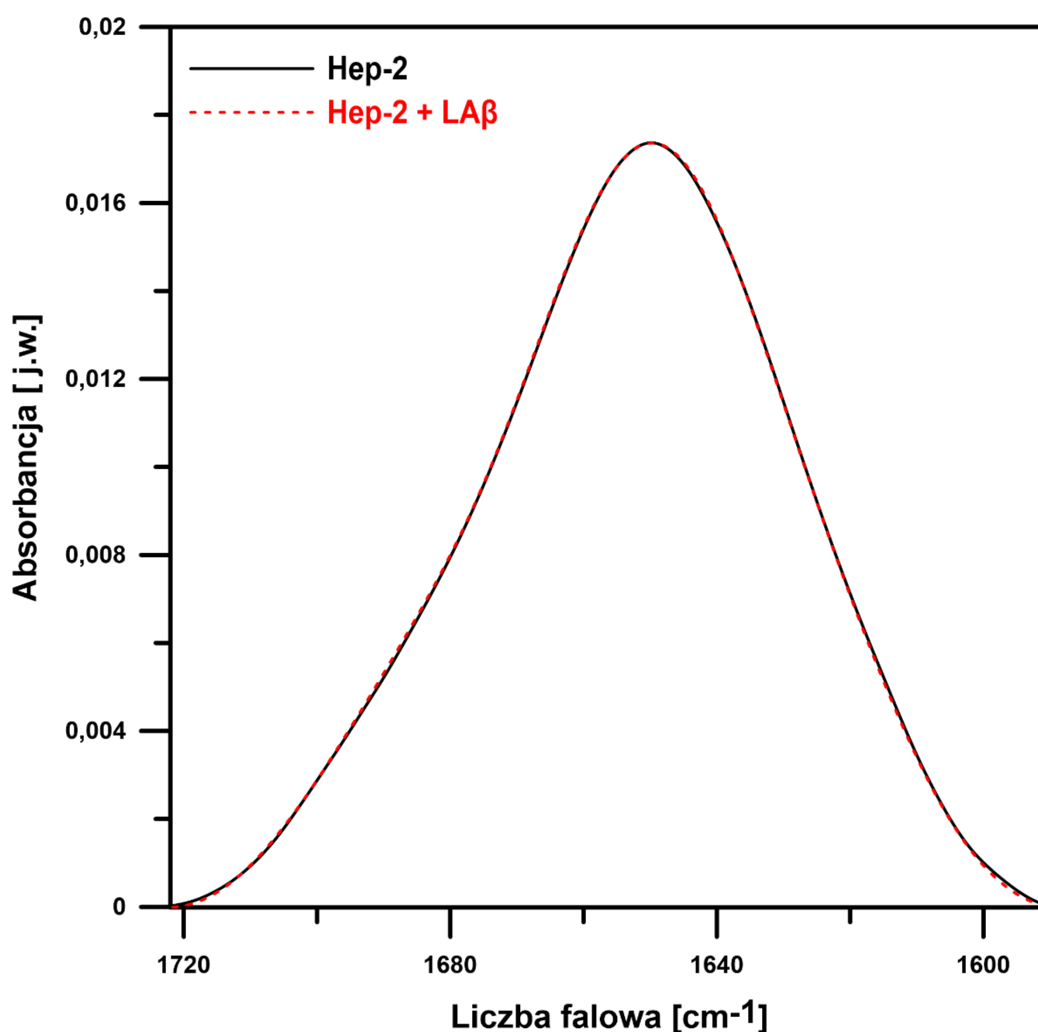
4.2.3. Interakcje lenzozydu Aβ z lipidami i białkami komórek z linii Hep-2 po 24 godzinach inkubacji

Na rycinie 23 przedstawiono widma FTIR komórek kontrolnych raka krtani (Hep-2) i inkubowanych z badanym związkiem przez 24 godziny oraz widmo różnicowe. Podobnie jak w przypadku linii HeLa widma były normalizowane przy maksimum pasma charakterystycznego dla drgań antysymetrycznych rozciągających grupy $N^+– CH_3$.

Po dodaniu flawonoidu obserwowano obecność szerokiego, ujemnego pasma z maksimum przy 3286 cm^{-1} charakterystycznego dla drgań rozciągających O–H (Ryc. 23). Pasmo to wskazuje, że lenzozyd Aβ powoduje zmniejszone przyłączanie cząsteczek wody przez komórki za pomocą wiązań wodorowych. Lenzozyd Aβ nie wpływał na rejon lipidowy komórek (~ 900 -1200 cm^{-1}) oraz na rejon amidu I (1600-1700 cm^{-1}) (Ryc. 24).



Ryc. 23. Widma FTIR komórek raka krtani z hodowli kontrolnej (górny wykres, czarna linia) oraz komórek traktowanych LAβ przez 24 godziny (górny wykres, czerwona, przerywana linia). Na dolnym wykresie przestawiono widma czystego związku oraz widmo różnicowe.



Ryc. 24. Wpływ lenzozydu Aβ na region amidu I w komórkach kontrolnych linii Hep-2 i inkubowanych z lenzozydem Aβ przez 24 godziny.

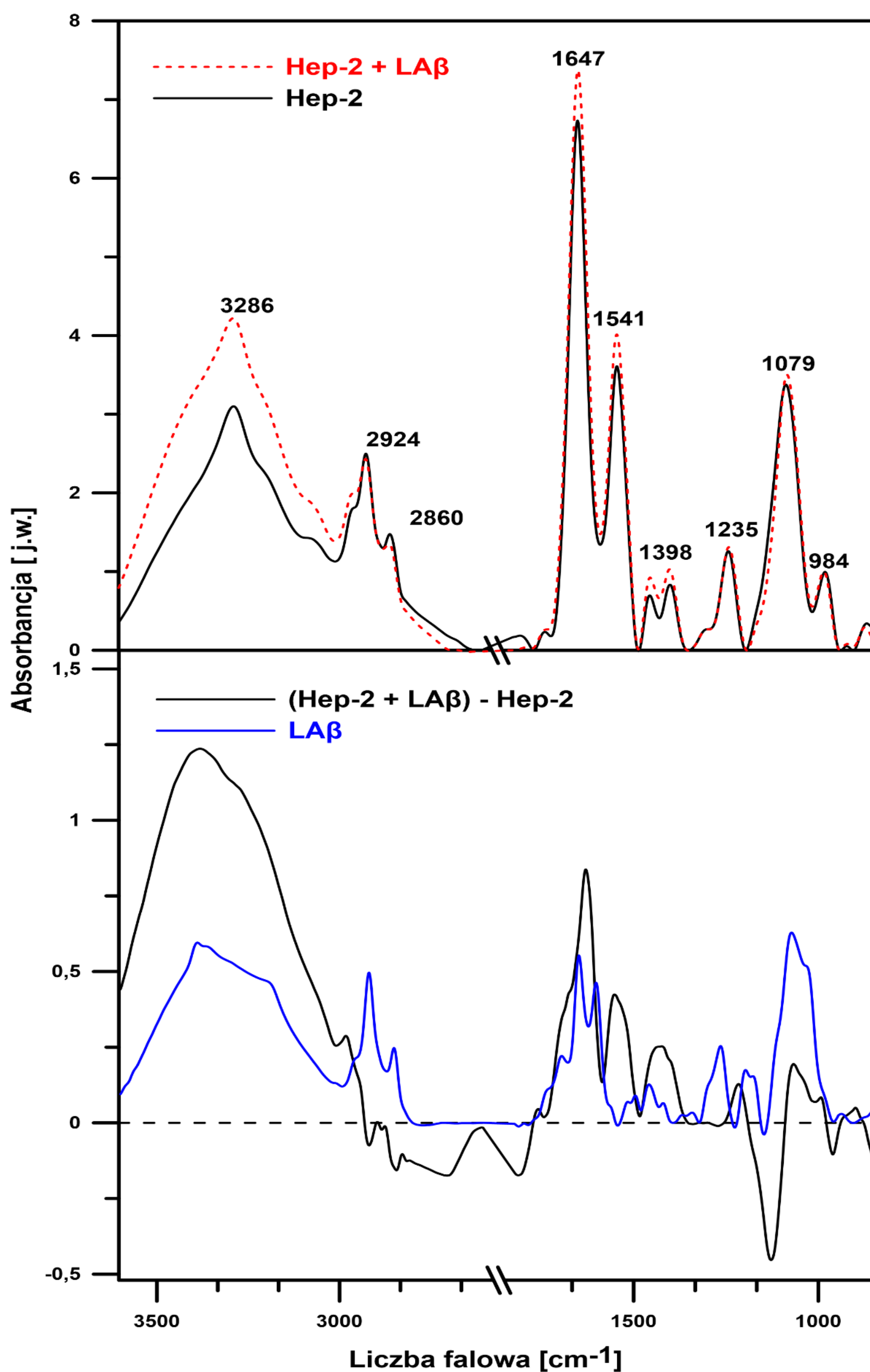
4.2.4. Interakcje lenzozydu Aβ z lipidami i białkami komórek z linii Hep-2 po 48 godzinach inkubacji

Rycina 25 przedstawia wyniki analiz spektroskopowych komórek kontrolnych Hep-2 i traktowanych badanym związkiem przez 48 godzin oraz widmo różnicowe. Podobnie jak wcześniej widma zostały znormalizowane przy maksimum pasma charakterystycznego dla drgań antysymetrycznych rozciągających grupy N^+– CH_3.

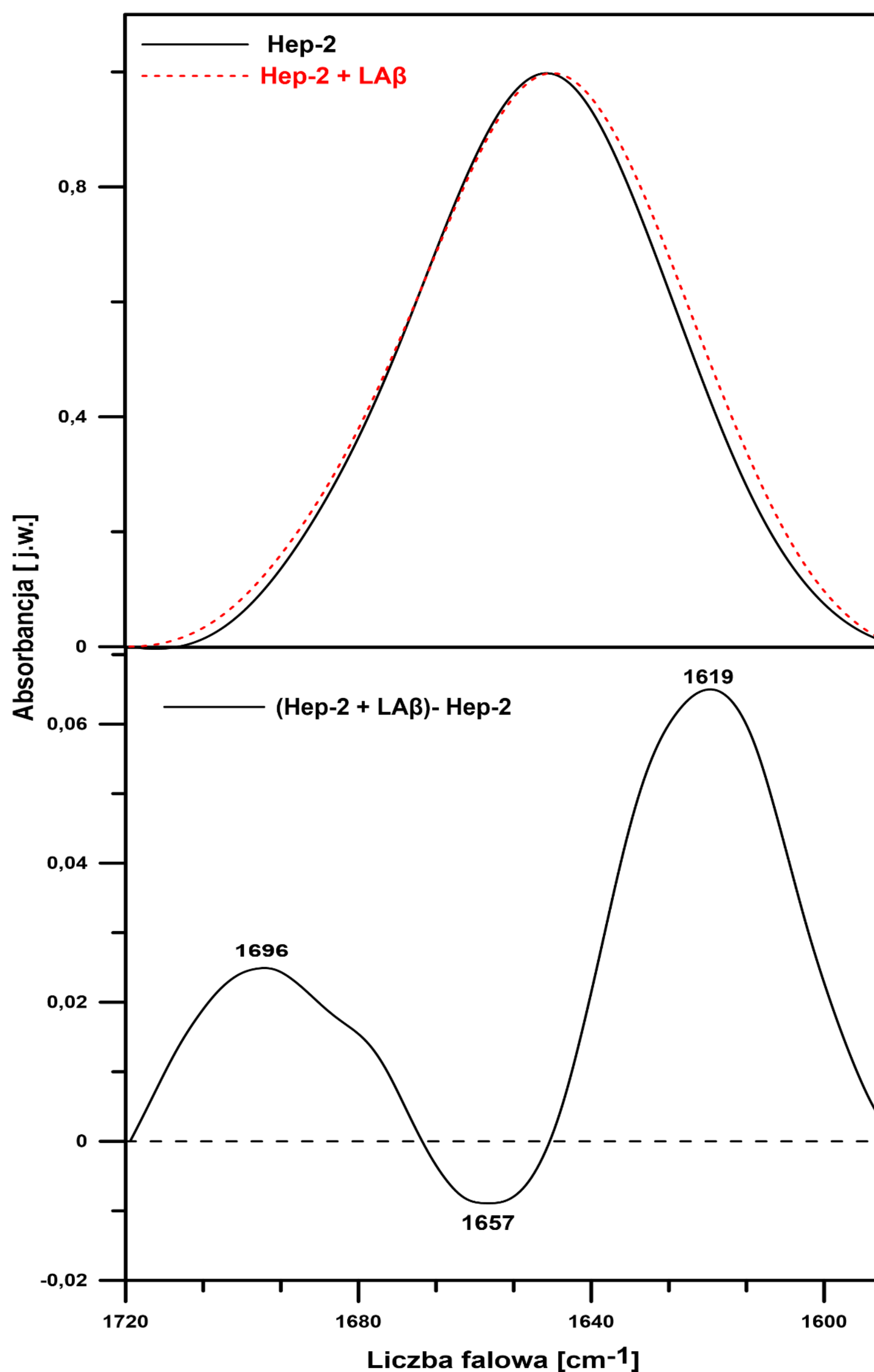
Analiza widm wykazała obecność szerokiego, dodatniego pasma z maksimum przy 3289 cm^{-1} o dużej intensywności charakterystycznego dla drgań rozciągających O–H. Taki wynik wskazuje na to, że lenzozyd Aβ zwiększa przyłączanie cząsteczek wody przez komórki za pomocą wiązań wodorowych. Dodanie flawonoidu spowodowało również silny

efekt w rejonie lipidowym komórek (~ 900 -1200 cm^{-1}). W rejonie grup polarnych fosfolipidów, w pasmie odpowiadającym drganiom rozciągającym grupy C-O-P-O-C (1079 cm^{-1}), nastąpił wzrost intensywności oraz przesunięcie pasma w kierunku niższych częstotliwości. Wskazuje to wyraźnie na miejsce interakcji badanego związku oraz oddziaływanie pomiędzy głowami polarnymi lipidu a badanym związkiem za pomocą wiązań wodorowych. Dodanie flawonoidu spowodowało bardzo wyraźny efekt w rejonie amidu I (1600-1700 cm^{-1}) oraz amidu II (1510-1580 cm^{-1}) białek (Ryc. 25).

Dodatnie pasma w rejonie amidu I z maksimum przy 1647 cm^{-1} i amidu II z maksimum przy 1541 cm^{-1} dowodzą, że lenzozyd Aβ zwiększa ilość komponentu białkowego komórek. Analiza pasma regionu amidu I (Ryc. 26) pozwala na badanie molekularnej organizacji białek. W regionie amidu I badany związek powodował wzrost ilości antyrównoległych β-kartek (1696 cm^{-1}) oraz β-kartek (1619 cm^{-1}). Jednocześnie obniżał ilość α-helis i nieuporządkowanych struktur białkowych (1657 cm^{-1}). Wskazuje to, na prawdopodobieństwo częściowej agregacji białek komórek linii Hep-2 pod wpływem lenzozydu Aβ.



Ryc. 25. Na panelu górnym przedstawiono widma absorpcyjne w podczerwieni komórek kontrolnych linii Hep-2 (czarna linia) i inkubowanych z LAβ przez 48 godzin (czerwona przerywana linia). Dolny panel przedstawia widmo samego flawonoidu oraz widmo różnicowe.



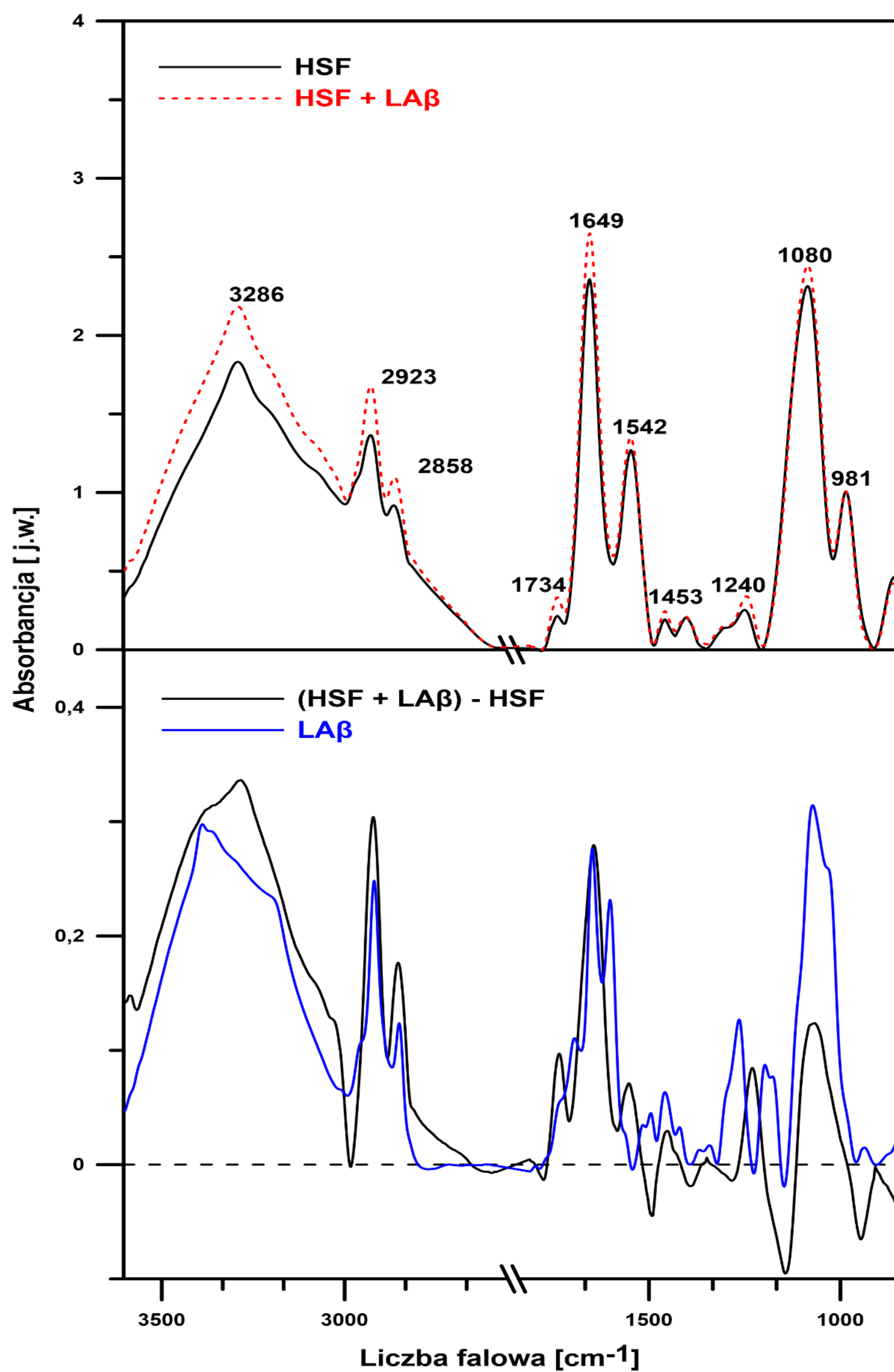
Ryc. 26. Zmiany w regionie amidu I w komórkach Hep-2 inkubowanych z lenzozydem Aβ (LAβ) przez 48 godzin (czerwona, przerywana linia). Na dolnym wykresie widmo różnicowe.

4.2.5. Interakcje lenzozydu Aβ z lipidami i białkami komórek z linii HSF po 24 godzinach inkubacji

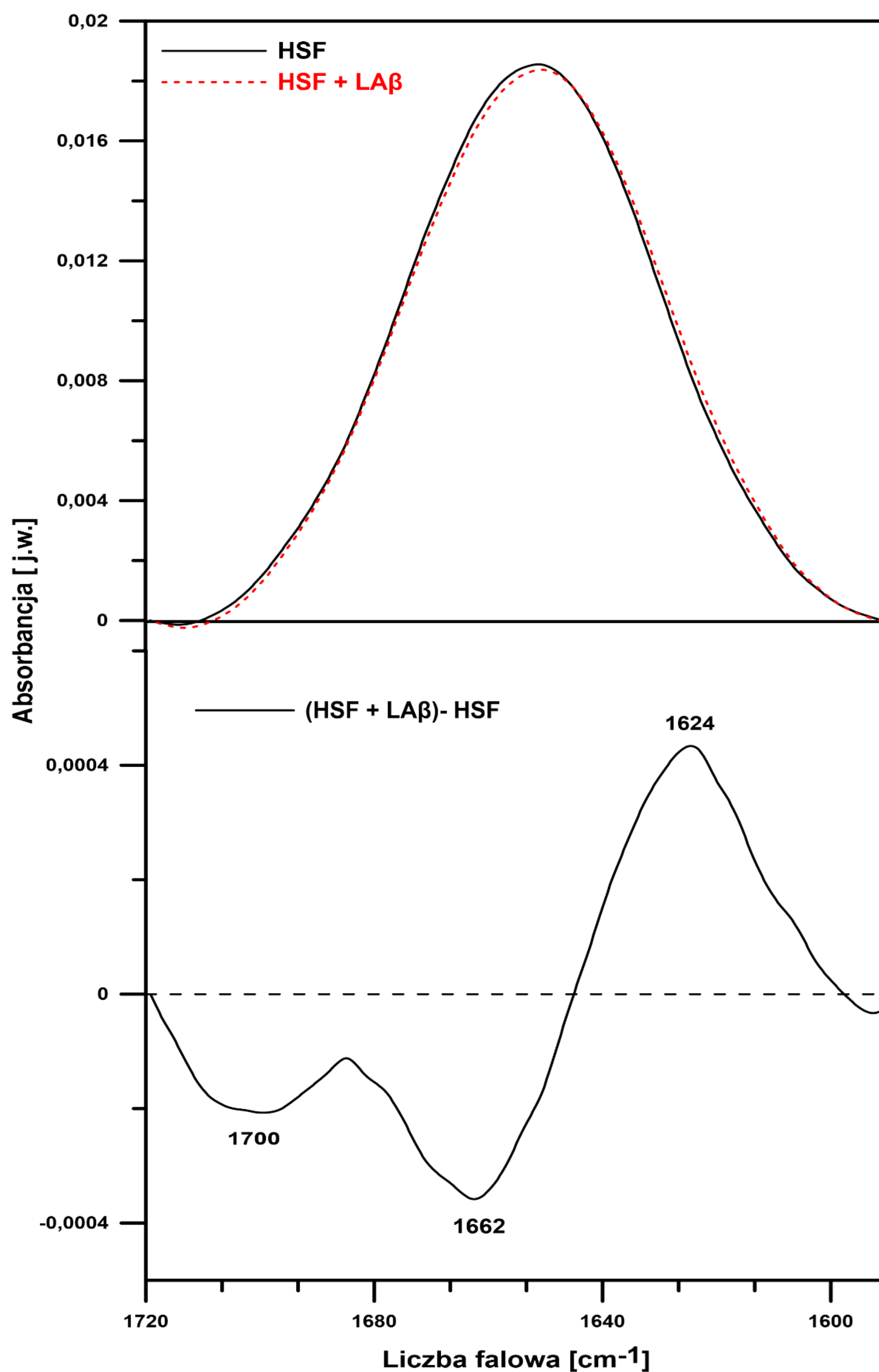
Widma FTIR komórek kontrolnych fibroblastów skóry człowieka (HSF) i inkubowanych z lenzozydem Aβ oraz widmo różnicowe i widmo samego lenzozydu Aβ obrazuje rycina 27. Widma normalizowano do jedynki przy maksimum pasma przy 980 cm^{-1}.

Badania FTIR wskazują na niewielki wpływ lenzozydu Aβ na fibroblasty skóry człowieka. Analiza widma różnicowego wykazała, że badany flawonoid powoduje wzrost siły oscylatora w rejonie estrowych grup karbonylowych lipidów (1738 cm^{-1}) co dowodzi, że oddziałuje on w tym rejonie za pomocą wiązań wodorowych. Ponadto, w widmie różnicowym widoczne jest przesunięcie pasma odpowiadającego drganiom antysymetrycznym grup – PO_2^- w kierunku niższych częstości z maksimum przy 1232 cm^{-1} co wskazuje na niewielkie działanie usztywniające w stosunku do frakcji lipidowej. Dodatnie pasmo w widmie różnicowym z maksimum przy 1649 cm^{-1} dowodzi, że badany związek powoduje wytworzenie dodatkowych białek (Ryc. 27).

Dodanie lenzozydu Aβ spowodowało efekt w rejonie amidu I białek (Ryc.28). Analiza molekularna organizacji białek wykazała, że w regionie amidu I lenzozyd Aβ zmniejszył ilość struktur typu skręty oraz struktur nieuporządkowanych (1662 cm^{-1}) jednocześnie zwiększając ilość struktur typu β-kartki (1624 cm^{-1}). Prawdopodobnie pod wpływem badanego flawonoidu dochodzi do nieznacznej agregacji białek.



Ryc. 27. Analiza widm FTIR komórek linii HSF kontrolnych (czarna linia) i inkubowanych z lenzozydem Aβ (LAβ) przez 24 godziny (czerwona, przerywana linia) oraz widmo LAβ i widmo różnicowe (dolny panel).

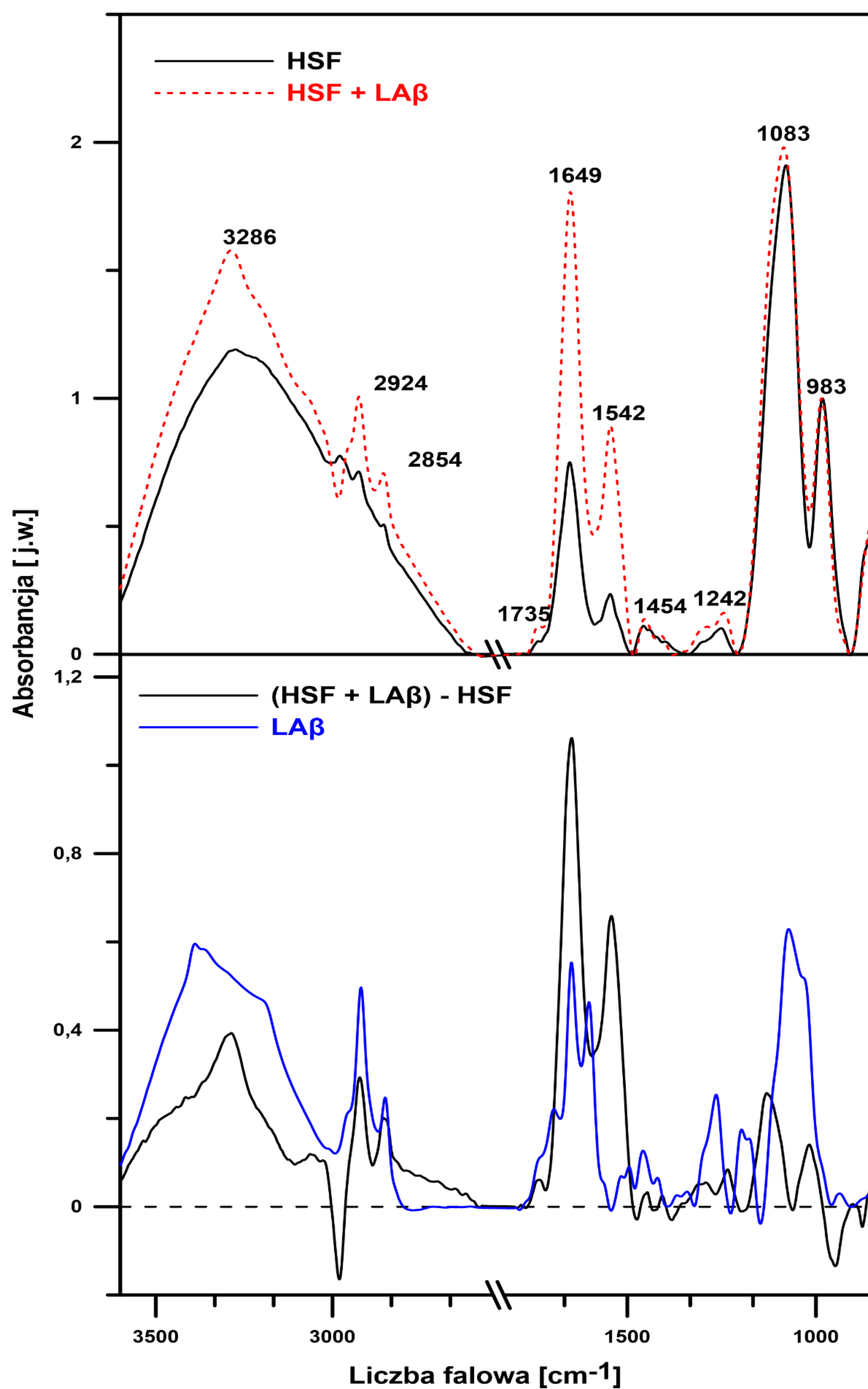


Ryc. 28. Region amidu I w komórkach kontrolnych fibroblastów skóry człowieka (HSF) (górny panel, czarna linia) i inkubowanych z lenzozydem Aβ (LAβ) przez 24 godziny (górny panel, czerwona przerywana linia) oraz widmo różnicowe (dolny panel).

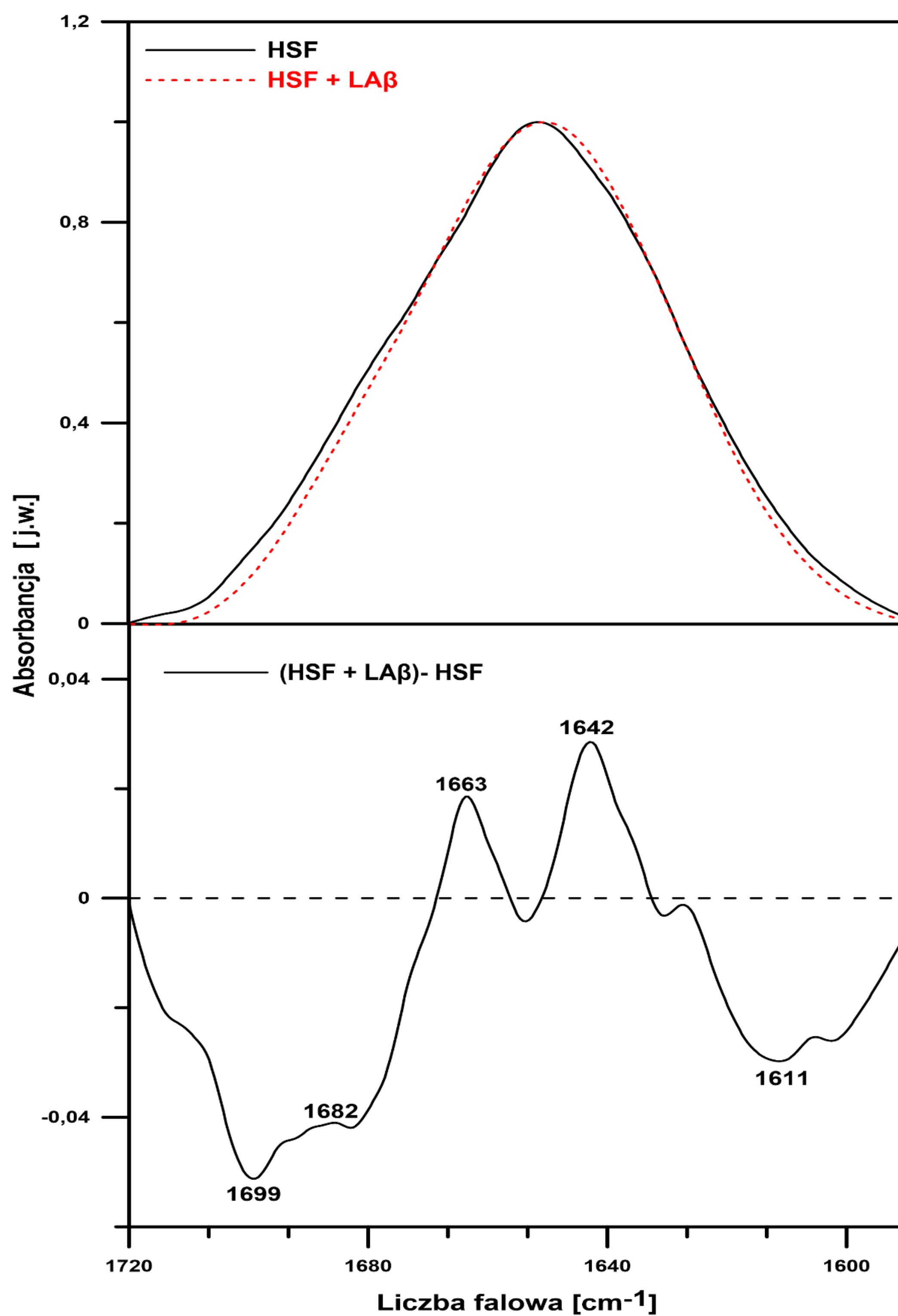
4.2.6. Interakcje lenzozydu Aβ z lipidami i białkami komórek z linii HSF po 48 godzinach inkubacji

Rycina 29 przedstawia widma absorpcyjne w podczerwieni komórek z hodowli kontrolnych fibroblastów skóry człowieka i poddanych działaniu badanego związku oraz widmo różnicowe. Podobnie jak przy wcześniejszych analizach widma były normalizowane przy maksimum pasma charakterystycznego dla drgań antysymetrycznych rozciągających grupy $N^+ – CH_3$.

Dodanie lenzozydu Aβ spowodowało zmiany w rejonie amidu I (1600-1700 cm^{-1}) i amidu II (1510-1580 cm^{-1}) białek (Ryc. 30). Dodatnie pasmo w obszarze amidu I z maksimum przy 1649 cm^{-1} świadczy najprawdopodobniej o wzroście stężenia białek. Szczegółowa analiza tego regionu wykazała, że po 48 godzinnej inkubacji z badanym związkiem powstają nowe białka charakteryzujące się wysoką zawartością struktur typu β-kartek i skrętów oraz stosunkowo niższą zawartością antyrównoległych β-kartek i nieuporządkowanych struktur białkowych.



Ryc. 29. Widma absorpcyjne w podczerwieni komórek linii HSF kontrolnych (górny panel, czarna linia) i inkubowanych z lenzozydem Aβ (LAβ) przez 48 godzin (górny panel, czerwona przerywana linia) oraz widmo różnicowe (dolny panel).



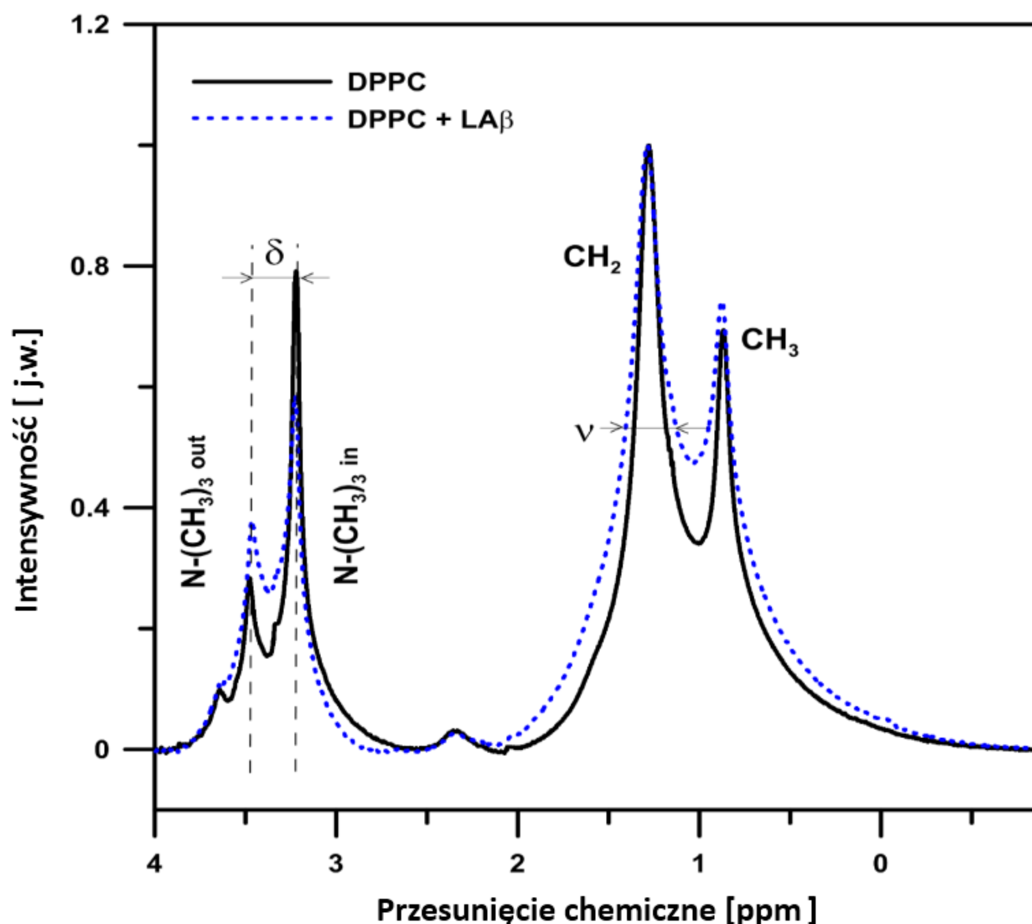
Ryc. 30. Widma FTIR z regionu amidu I komórek linii HSF z hodowli kontrolnej (czarna linia) i poddanych działaniu lenzozydu Aβ (LAβ) przez 48 godzin (czerwona, przerywana linia). Na dolnym panelu przedstawiono widmo różnicowe.

4.3. Wpływ lenzozydu Aβ na dynamiczne i strukturalne właściwości liposomów uformowanych z DPPC

Analiza widm ^1H NMR liposomów, w których widoczne są odpowiednie pasma rezonansowe pochodzące z różnych fragmentów cząsteczek lipidów ulokowanych w różnych rejonach dwuwarstwy lipidowej błony, pozwoliła na obserwacje zmian strukturalnych i dynamicznych właściwości błon pod wpływem lenzozydu Aβ. Rycina 31 przedstawia widmo ^1H NMR liposomów uformowanych z DPPC oraz liposomów z dodatkiem leznzozydu w stężeniu 1 mol% z widocznymi pasmami. Z prawej strony są widoczne pasma z obszaru hydrofobowego błony odpowiadające grupom CH_2 i CH_3 fosfolipidów. Pasma znajdujące się po lewej stronie, odpowiadają pasmom z regionu cholinowych głów polarnych fosfolipidów. Do zawiesiny liposomów dodano chlorku prazeodymu, co spowodowało powstanie dwóch pasm w rejonie polarnym. Pasmo przesunięte w kierunku wyższych wartości (ppm) odpowiada strefie grup cholinowych zewnętrznej warstwy liposomów natomiast pasmo przesunięte w kierunku niższych wartości (ppm) odpowiada strefie grup cholinowych wewnętrznej warstwy liposomów. Stosunek powierzchni pod pikami (I_{out}/I_{in}) pochodzącymi od sygnału z zewnętrznej i wewnętrznej warstwy liposomów, jest proporcjonalny do ilości głów cholinowych w wewnętrznej i zewnętrznej warstwie błony. Stosunek mniejszy niż 1 oznacza powstawanie liposomów wielowarstwowych, zaś większy liposomów jednowarstwowych.

Badania ^1H NMR, wykazały, że lenzozyd Aβ w niewielkim stopniu obniżył wartość parametru rozszczepienia (δ) w rejonie głów polarnych fosfolipidów z 0.6 ppm do 0.56 ppm. Wynikało to z poszerzenia pasma odpowiadającego strefie grup cholinowych wewnętrznej warstwy liposomów ($N\text{-}(CH_3)_3\ ^{in}$). Obecność flawonoidu spowodowała również zwiększenie parametru szerokości połówkowej maksimum (ν) odpowiadającego strefie grup cholinowych wewnętrznej ($N\text{-}(CH_3)_3\ ^{in}$) i zewnętrznej ($N\text{-}(CH_3)_3\ ^{out}$) warstwy liposomów odpowiednio o 22 % i 55 %. Badany związek zwiększył również wartość szerokości połówkowej maksimum odpowiadającego grupom $–CH_2$ w warstwie hydrofobowej lipidów (ν) z 0.25 do 0.30 ppm (o 17%). Dodanie flawonoidu zmieniło także stosunek I_{out}/I_{in}. W przypadku czystych liposomów sporządzonych z DPPC wynosił on 0.84, co sugeruje powstawanie liposomów wielowarstwowych. Zaś obecność lenzozydu Aβ spowodowała obniżenie stosunku I_{out}/I_{in} do wartości 0.57. Taki efekt jest związany najprawdopodobniej ze

zmianą właściwości fizycznych dwuwarstwy lipidowej przez LAβ. Badany związek powoduje tworzenie większych wielowarstwowych liposomów DPPC.

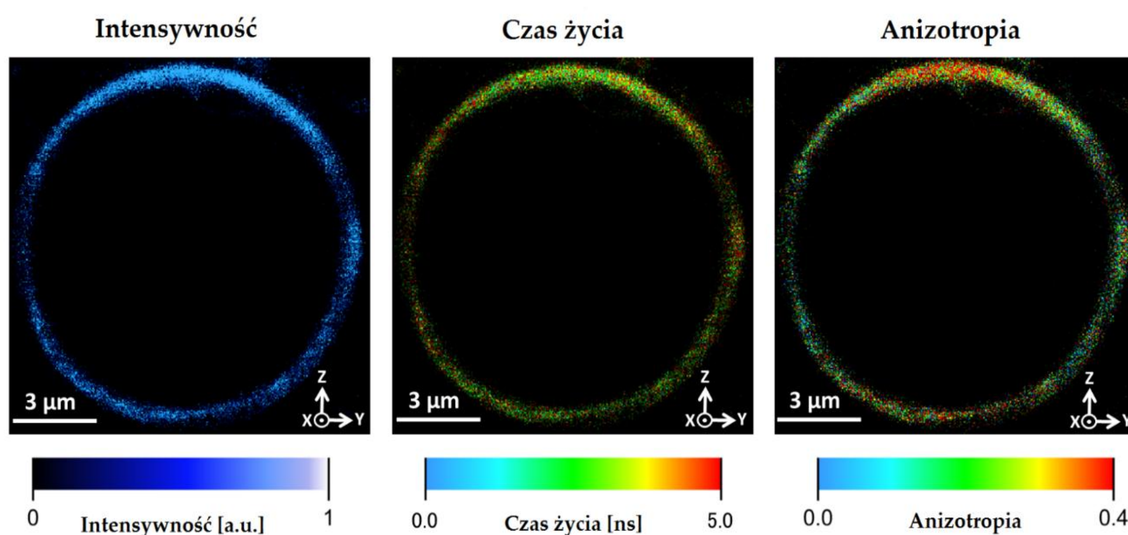


Ryc. 31. Widma ^{1}H NMR liposomów uformowanych z DPPC (linia ciągła) oraz liposomów DPPC z dodatkiem lenzozydu Aβ (linia przerywana).

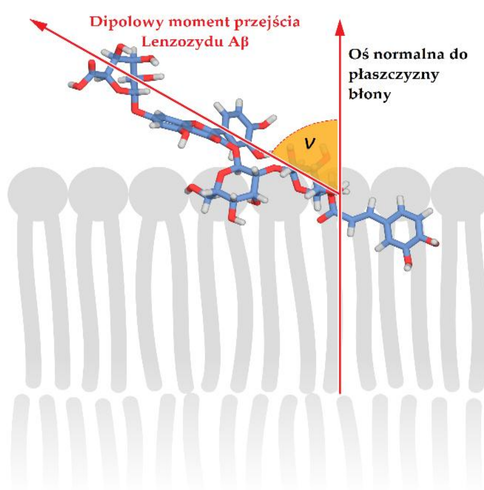
4.4. Oddziaływanie lenzozydu Aβ z błonami wielkich jednowarstwowych liposomów GUV uformowanych z DPPC

Rycina 32 przedstawia intensywność fluorescencji, czas życia fluorescencji oraz anizotropię pojedynczego liposomu typu GUV z wbudowanym lenzozydem Aβ w stosunku 0,5 mol% do duwarstwy lipidowej zbudowanej z DPPC. Obrazy ukazują przekrój zeskanowanego liposomu z płaszczyzny ogniskowej mikroskopu konfokalnego. Na otrzymanym obrazie intensywność fluorescencji jest znacznie wyższa w dolnym i górnym rejonie błony (oznaczona czerwonym kolorem na obrazie anizotropii) w porównaniu do

prawego i lewego regionu liposomu. Wynik ten wskazuje na planarną orientację przejścia dipolowego lenzozydu Aβ w stosunku do płaszczyzny błony. Potwierdzają to również obliczenia kąta pomiędzy kierunkiem przejścia dipolowego związku wbudowanego w dwuwarstwę lipidową a osią normalną do płaszczyzny błony, oparte na intensywności fluorescencji. Wartość tego kąta wynosi 58.9 ±1.2. Na tej podstawie zasugerowano model orientacji lenzozydu Aβ w stosunku do dwuwarstwy lipidowej przedstawiony na ryc. 33. Taka orientacja sugeruje potencjalną rolę związku jako niebieskiego filtra światła.



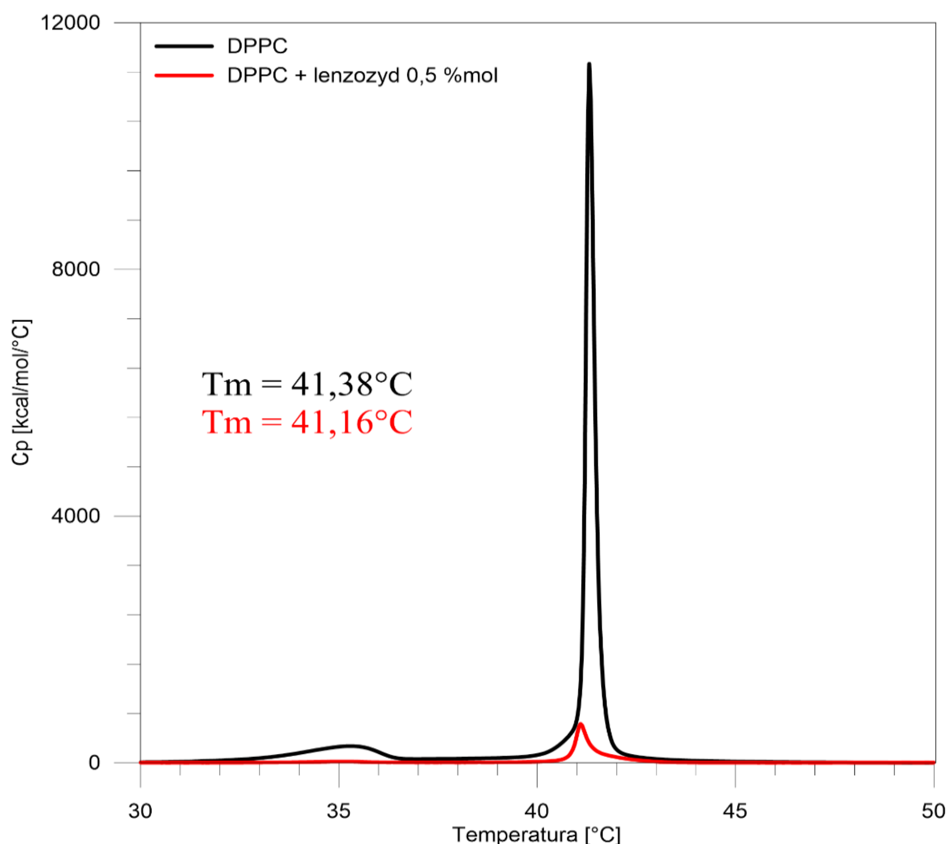
Ryc. 32. Wyniki obrazowania z zastosowaniem FLIM pojedynczego, reprezentatywnego pęcherzyka lipidowego z wbudowanym do fazy lipidowej lenzozydem Aβ. Trzy panele przedstawiają kolejno intensywność fluorescencji, czas życia i anizotropię.



Ryc. 33. Model orientacji lenzozydu Aβ w stosunku do dwuwarstwy lipidowej błony.

4.5. Wpływ lenzozydu Aβ na fizyczne właściwości wielkich jednowarstwowych liposomów (GUV)

W badaniach zastosowano technikę różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Jako materiał badawczy wykorzystano wielkie jednowarstwowe liposomy uformowane z DPPC. Wyniki pomiarów przedstawiono na wykresie (Ryc. 34), a obliczone wartości parametrów w tabeli 2 (Tab. 2). Wykazano, że dodanie lenzozydu Aβ w stężeniu 0,5 %mol powodowało przesunięcie w niewielkim stopniu temperatury głównego przejścia fazowego w stronę niższych wartości. Jednocześnie flawonoid powodował zanik przedprzejścia fazowego. Ponadto, badany związek zmniejszył 10-krotnie entalpię kalorymetryczną. W czystych liposomach wynosiła ona 3542 ± 40 kJ/mol, a w lipidach z dodatkiem lenzozydu Aβ wynosiła 349 ± 5. Oddziałując z lipidami, związek zmniejszał również kooperatywność przejścia, monitorowaną jako szerokość połówkową piku ($T_{1/2}$). Wyniki te wskazują na bardzo istotny wpływ lenzozydu Aβ na właściwości strukturalne oraz dynamiczne błon lipidowych.



Ryc. 34. Termogramy liposomów utworzonych z DPPC dla lipidu bez dodatku (czarna linia) oraz dodatkiem 0,5 %mol LAβ (linia czerwona).

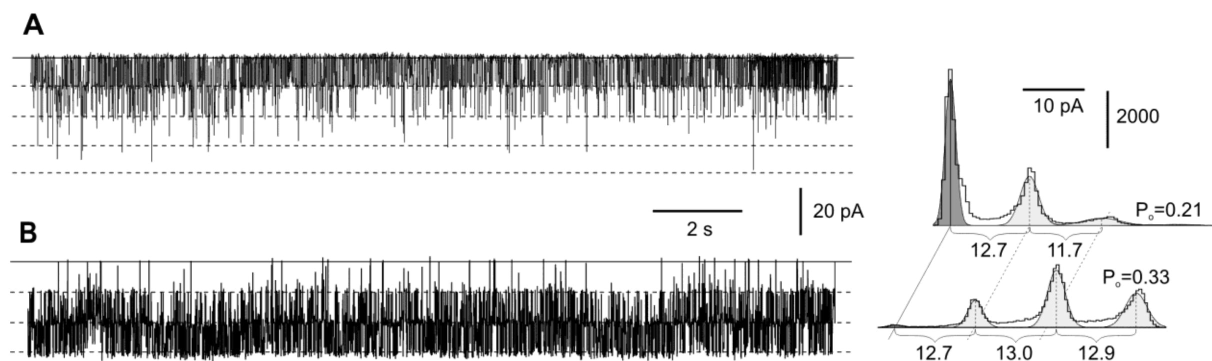
Tab. 2. Właściwości temperatury przejścia fazowego (T_m), entalpii kalorymetrycznej (ΔH_{cal}) oraz szerokości połówkowej piku ($T_{1/2}$) wyznaczonych na podstawie termogramów uzyskanych dla wielkich liposmów utworzonych z DPPC oraz liposomow z dodatkiem 0,5 %mol LAβ.

Parametry / Próbka	T_m [°C]	ΔH_{cal} [kJ/mol]	$T_{1/2}$ [°C]
DPPC	41,38 ± 0,01	3542 ± 40	0,24 ± 0,01
DPPC + 0,5 %mol lenzozyd Aβ	41,16 ± 0,01	349 ± 5	0,45 ± 0,01

4.6. Wpływ lenzozydu Aβ na aktywność kanałów potasowych w fibroblastach skóry człowieka (HSF)

Do oceny wpływu lenzozydu Aβ na aktywność kanałów potasowych zastosowano metodę patch-clamp. W badaniach mierzono aktywność pojedynczych kanałów, na postawie której uzyskano krzywą prądowo-napięciową, która przecinała się z osią odciętych w pobliżu potencjału odwrócenia dla jonów K^+ (Ryc. 35 C). Oznacza to, że rejestrowane kanały były przepuszczalne głównie dla tego jonu. Po 24-godzinnej inkubacji z LAβ obserwowano wzrost prawdopodobieństwa otwarcia tych kanałów (Ryc. 35 D).Największe prawdopodobieństwo otwarcia kanałów potasowych odnotowano przy napięciu 0 mV. Potwierdziły to również histogramy amplitud rejestrowanych prądów stworzone na postawie 18 s zapisów (Ryc. 36).

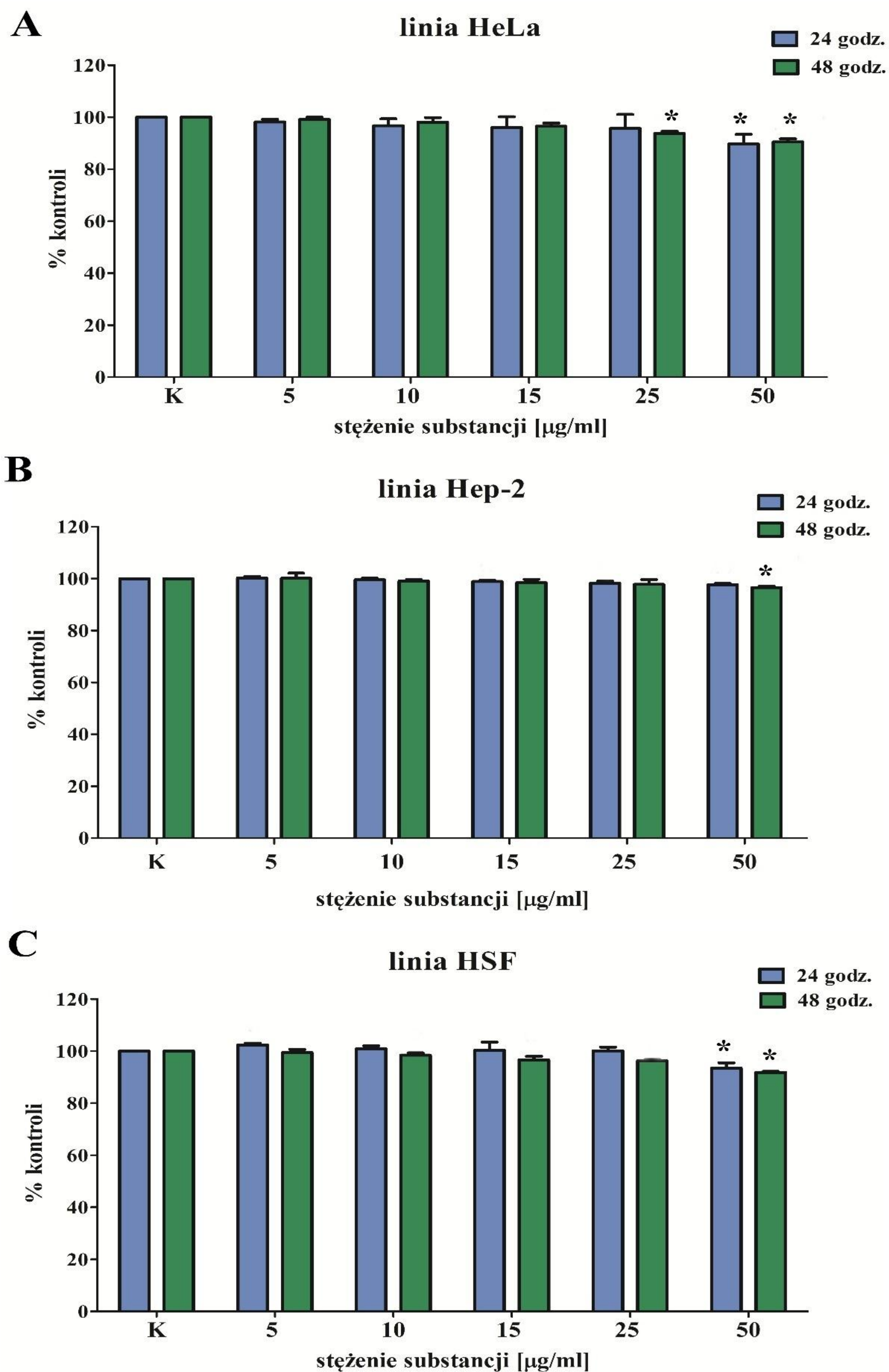
Ryc. 35. A - Aktywność pojedynczych kanałów w komórkach HSF, B - Aktywność pojedynczych kanałów w komórkach HSF poddanych działaniu lenzozydu Aβ, C - charakterystyka prądowo-napięciowa kanałów w komórkach, D - wykres przedstawiający prawdopodobieństwo otwarcia kanału w warunkach standardowych i po inkubacji z badanym związkiem.



Ryc. 36. Porównanie aktywności pojedynczych kanałów obecnych w fibroblastach skóry człowieka przed (A) i po inkubacji z lenzozydem Aβ (B).

4.7. Analiza komórek testem czerwieni obojętnej (NR)

Wpływ lenzozydu Aβ na żywotność komórek z hodowli *in vitro* określono za pomocą testu czerwieni obojętnej. Uzyskane wyniki wykazały, że badany związek charakteryzuje się niewielką cytotoksycznością w stosunku do komórek nowotworowych i prawidłowych w obu czasach inkubacji i we wszystkich badanych dawkach. W przypadku linii HeLa po 48 godzinach inkubacji odnotowano obniżenie żywotności do 90,5% w najwyższej dawce flawonoidu (Ryc. 37 A). Najsłabsze działanie cytotoksyczne obserwowano w komórkach linii Hep-2, których żywotność po 48 godzinach w stężeniu 50 μg/ml wynosiła 96,6 % (Ryc. 37 B). W komórkach prawidłowych poddanych działaniu lenzozydu Aβ żywotność zmniejszyła się do 93,5 i 91,8% odpowiednio po 24 i 48 godzinach inkubacji (Ryc. 37 C).



Ryc. 37. Wpływ lenzozydu Aβ na żywotność komórek z linii HeLa, Hep-2 i HSF. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD, n=3, * $p \leq 0,05$; test t-Studenta.

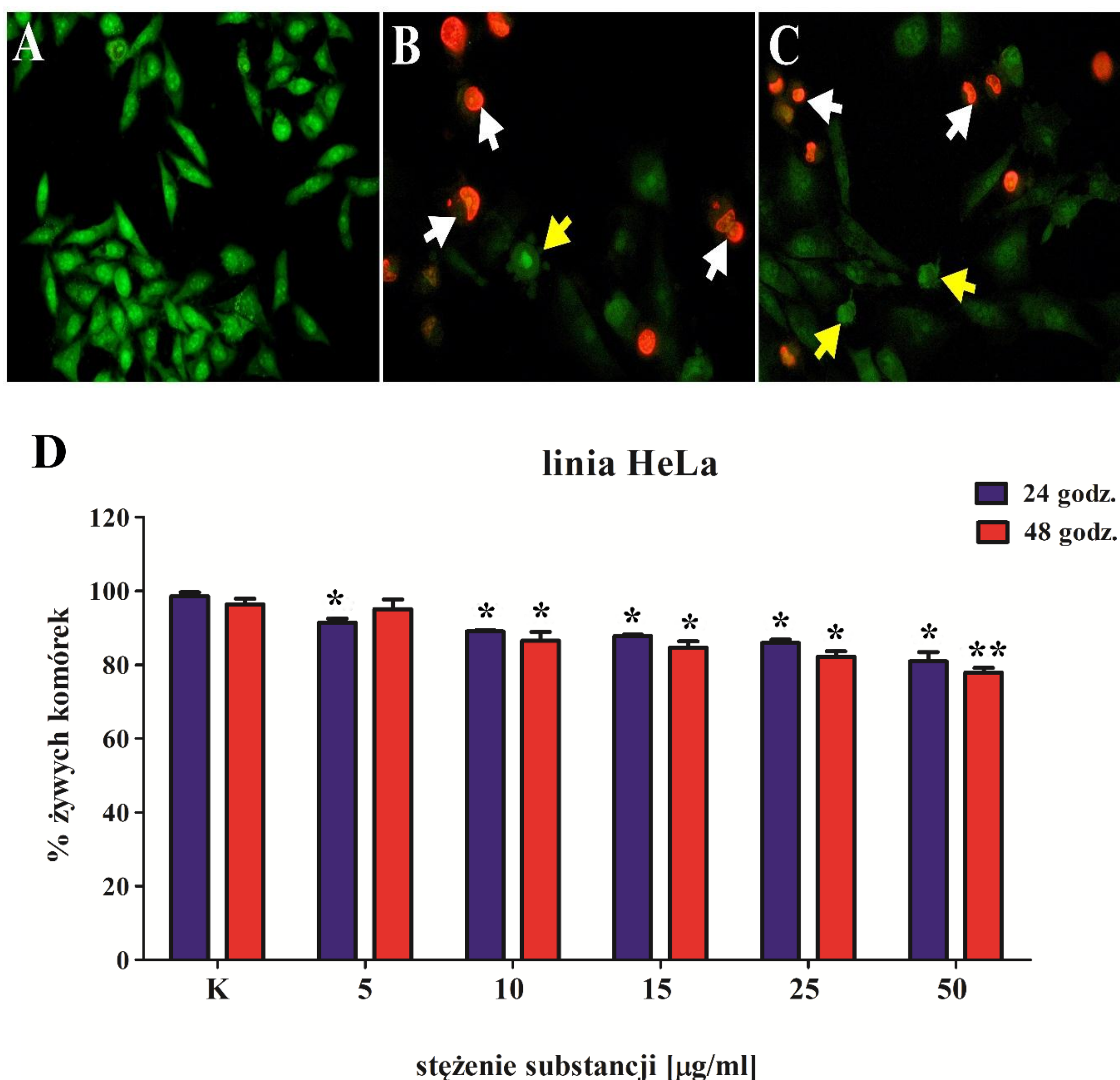
4.8. Analiza cytotoksyczności komórek testem LIVE/DEAD

Cytotoksyczne właściwości lenzozydu Aβ na komórki z hodowli *in vitro* oceniono dodatkowo za pomocą testu LIVE/DEAD. Test ten opiera się na różnej przepuszczalności błon żywych i martwych komórek. Komórki żywe z nienaruszoną błoną komórkową wybarwiają się na kolor zielony, natomiast komórki z uszkodzoną błoną (martwe) wybarwiają się na kolor czerwony.

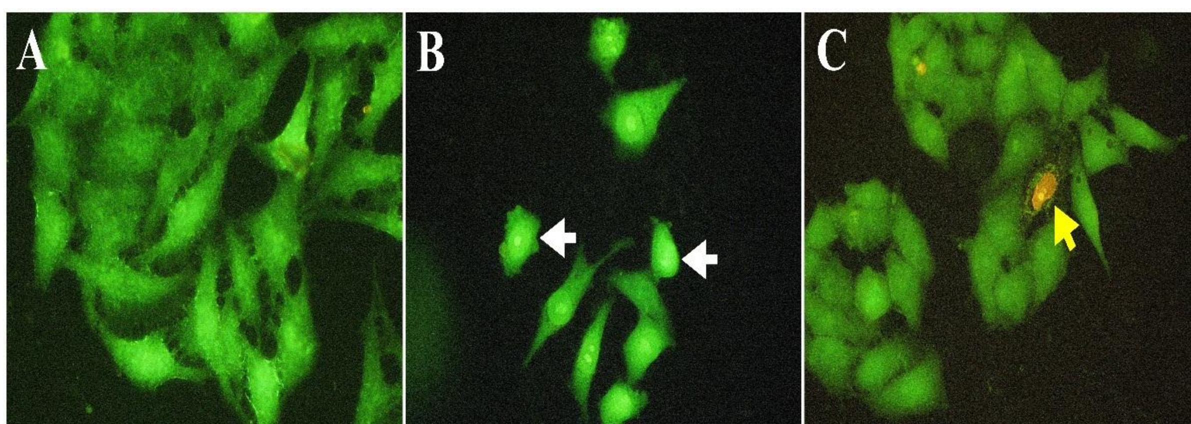
Analiza mikroskopowa komórek z hodowli HeLa poddanych działaniu badanego flawonoidu wykazała wzrost ilości komórek wybarwionych na kolor czerwony (Ryc. 38 B i C). Obserwowano również obecność obkurczonych komórek z licznymi pęcherzykami błony komórkowej (żółte strzałki) (Ryc. 38 B i C). Wraz ze wzrostem stężenia związku malała ilość żywych komórek do 80,9 ± 2,5% w najwyższym stężeniu (24-godzinna inkubacja). Dłuższy czas inkubacji procent żywych komórek wynosił 77,8 ± 1,3% w dawce 50 μg/ml (Ryc. 38 D).

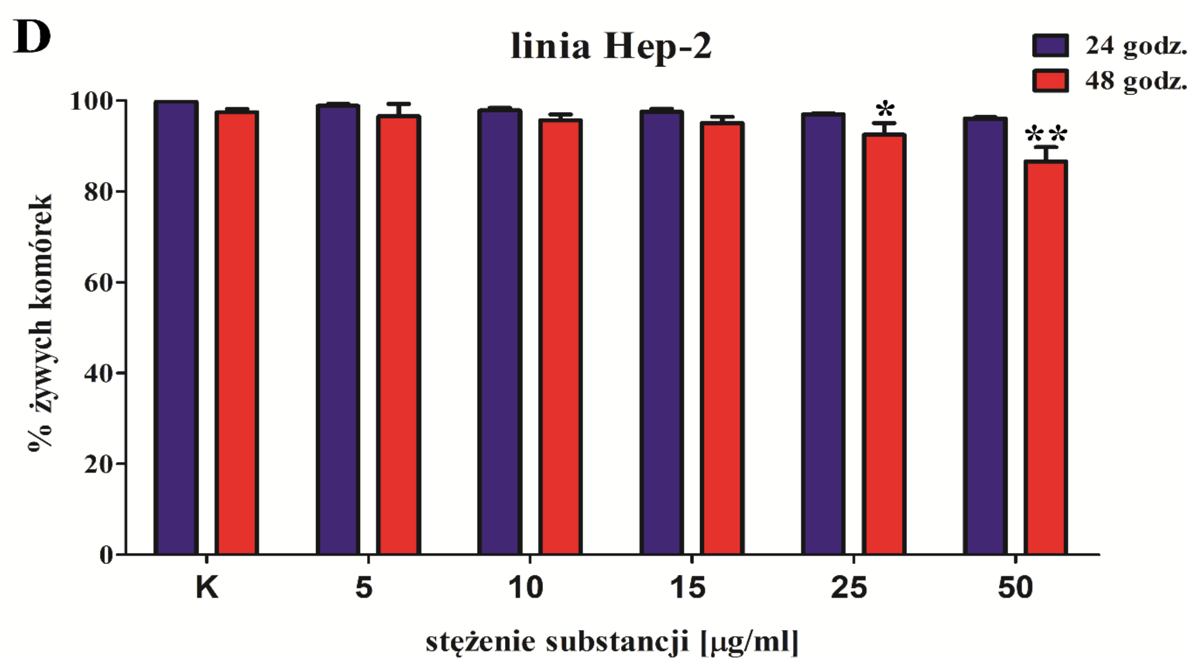
W komórkach z linii Hep-2 traktowanych lenzozydem Aβ obserwowano niewielką ilość komórek z uszkodzoną błoną komórkową (wybarwionych na kolor czerwony). W obrazie mikroskopowym obecne były obkurczone komórki (Ryc. 39 B i C). 24-godzinna inkubacja z flawonoidem w niewielkim stopniu obniżyła ilość komórek żywych do 96,1 ± 0,3% w stężeniu 50 μg/ml. Wydłużenie czasu inkubacji do 48 godzin spowodowało obniżenie żywotności o 13,4 % (Ryc. 39 D).

W przypadku 24 godzinnej inkubacji komórek linii HSF z badanym związkiem obserwowano niewielką ilość komórek wybarwionych na czerwono. Komórki wykazywały normalną morfologię, nie odnotowano obkurczonych komórek (Ryc. 40 B i C). Wraz ze wzrostem stężenia lenzozydu Aβ ilość komórek żywych nieznacznie zmalała. Najsilniejsze działanie obserwowano w stężeniu 50 μg/ml. W przypadku komórek poddanych działaniu flawonoidu przez 48 godzin nastąpiło zmniejszenie poziomu komórek żywych do 92,1% jedynie w najwyższej dawce (Ryc. 40 D).

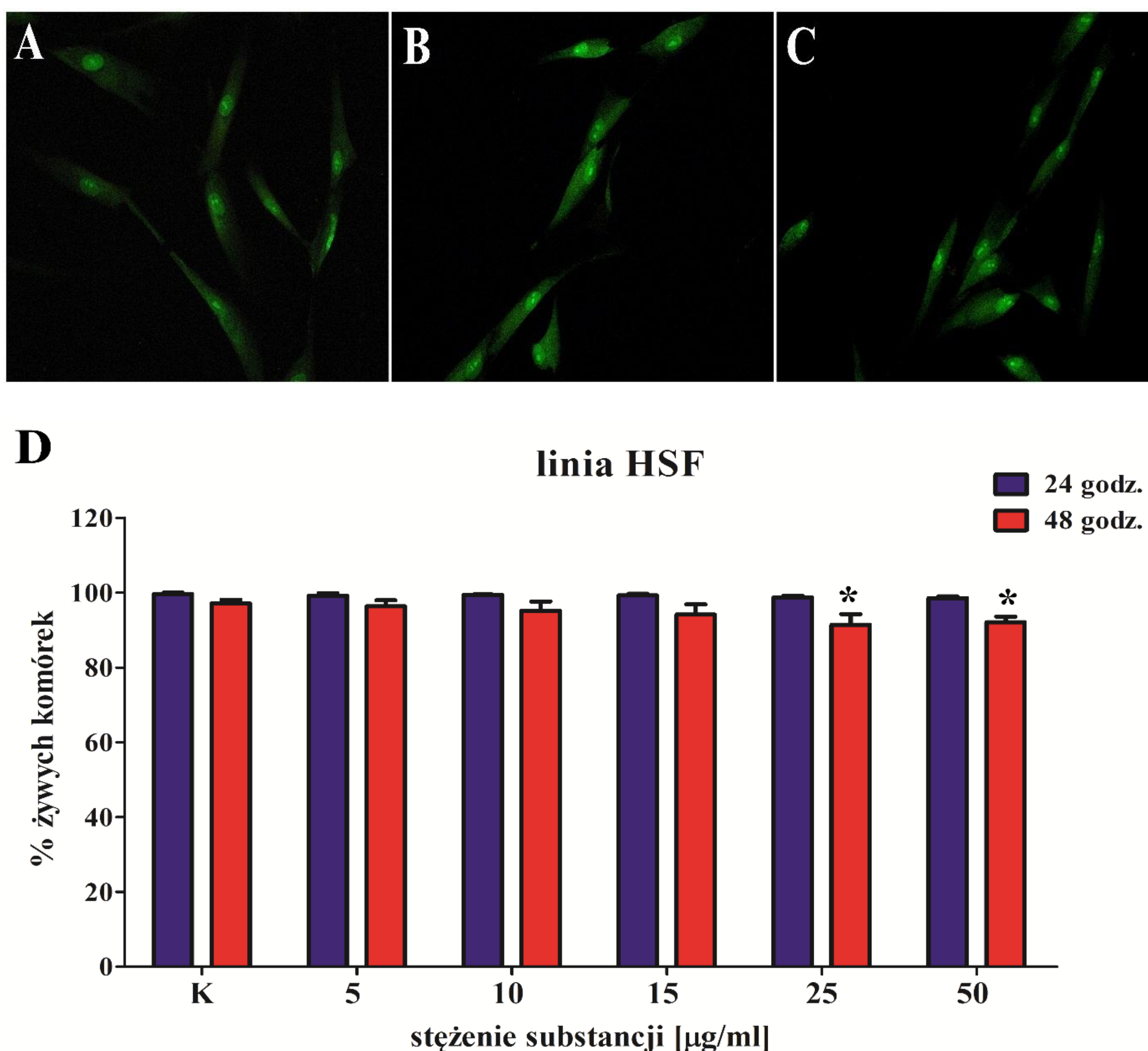


Ryc. 38. Cytotoksyczne działanie lenzozydu Aβ na komórki HeLa. A - komórki kontrolne z linii HeLa, B-C - komórki linii HeLa inkubowane z badanym flawonoidem , komórki z uszkodzoną błoną są wybarwione na kolor czerwony (białe strzałki), obecne są również obkurczone komórki z licznymi pęcherzykami błonowymi (żółte strzałki), D - procent żywych komórek po inkubacji z lenzozydem Aβ. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD, n =3; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; test t-Studenta.





Ryc. 39. Wpływ lenzozydu Aβ na żywotność komórek linii Hep-2. A - komórki kontrolne raka krtani, B - komórki poddane działaniu badanego związku, widoczne obkurczone komórki z pęcherzykami błonowymi (białe strzałki), C - komórki linii Hep-2 poddane działaniu badanego związku, obecne komórki o jądrach wybarwionych na czerwono (żółta strzałka), D – procent żywych komórek po inkubacji z lenzozydem Aβ. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD, n=3, * $p \leq 0{,}05$; ** $p \leq 0{,}005$; t-Studenta.



Ryc. 40. Efekt aktywności lenzozydu Aβ na żywotność komórek linii HSF. A - komórki kontrolne linii HSF, B-C - komórki linii HSF traktowane badanym flawonoidem, D - procent żywych komórek po inkubacji z lenzozydem Aβ. Wyniki przedstawiono jako średnie + SD, n=3, * $p \leq 0,05$; test t-Studenta.

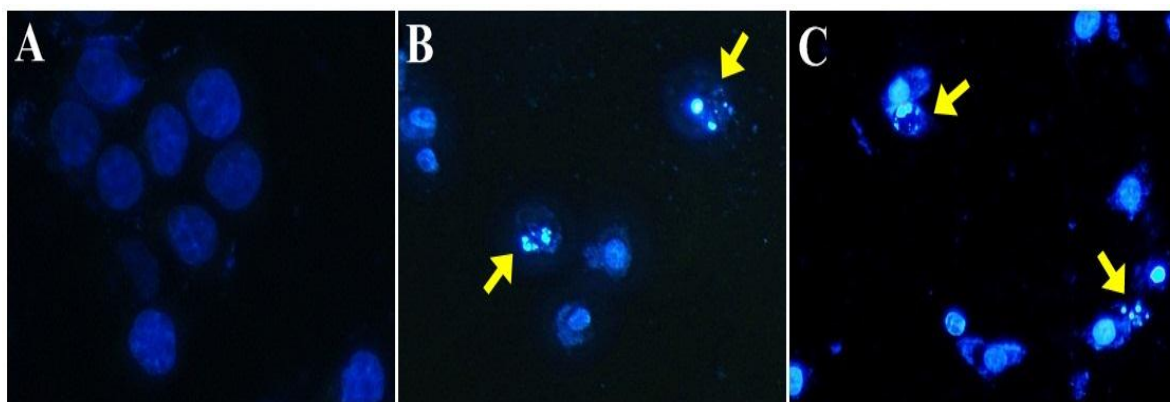
4.9. Indukcja apoptozy i nekrozy w komórkach z hodowli *in vitro* pod wpływem lenzozydu Aβ

W celu określenia rodzaju śmierci komórkowej, indukowanej przez badany flawonoid wykonano barwienie komórek jodkiem propidionowym i barwnikiem Hoechst 33342. Komórki linii HeLa, Hep-2 oraz HSF inkubowano z lenzozydem Aβ przez 24 i 48 godzin w stężeniach 5, 10, 15, 25 i 50 µg/ml. Komórki wykazujące określony rodzaj śmierci zliczono i przedstawiono w stosunku do komórek żywych (Ryc. 41-43).

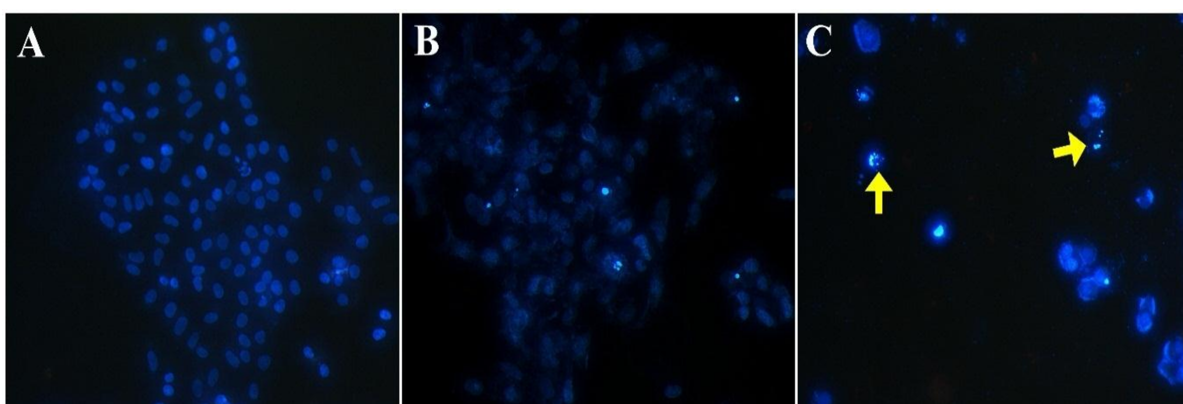
W przypadku komórek z linii HeLa poddanych działaniu lenzozydu Aβ odnotowano wzrost poziomu apoptozy wraz ze wzrostem stężenia badanego związku (Ryc. 44 A). W porównaniu do komórek kontrolnych apoptoza wzrosła od 2,11 ± 0,43 % do 6,93 ± 3,07 %, 12,81 ± 2,05 %, 11,27 ± 1,94 %, 17,16 ± 1,27 % i 15,27 ± 3,15 % po 24 godzinnej inkubacji odpowiednio z 5, 10, 15, 25 i 50 μg/ml flawonoidu. Najwięcej komórek apoptotycznych odnotowano w dawce 25 μg/ml. Obserwowano również wzrost ilości komórek nekrotycznych od 0,31 ± 0,31 % w kontroli do 3,7 ± 2,52 % w komórkach traktowanych badanym związkiem w stężeniu 25 μg/ml. Po 48 godzinnej inkubacji komórek raka szyjki macicy z lenzozydem Aβ również nastąpił wzrost ilości komórek apoptotycznych wraz ze wzrostem stężenia związku (Ryc. 44 B). Najwyższy poziom apoptozy odnotowano w stężeniu 50 μg/ml. Nastąpił również wzrost poziomu nekrozy, który przy najwyższym stężeniu wynosił 3,5 ± 0,7%.

W komórkach linii Hep-2 lenzozyd Aβ w niewielkim stopniu indukował apoptozę (Ryc. 45). W porównaniu do komórek kontrolnych ilość komórek apoptotycznych wzrosła od 1,22 ± 0,2% w kontroli do 2,33 ± 0,26%, 3,52 ± 0,31%, 3,85 ± 0,32, 3,65 ± 0,21% i 4,13 ± 0,45% po 24 godzinnej inkubacji z flawonoidem odpowiednio w stężeniu 5, 10, 15, 25 i 50 μg/ml. Najwyższy poziom apoptozy i nekrozy odnotowano przy stężeniu 50 μg/ml (Ryc. 45 A). Po 48 godzinach inkubacji nastąpił wzrost ilości komórek apoptotycznych i nekrotycznych w porównaniu do kontroli. Obserwowano wzrost poziomu apoptozy wraz ze wzrostem stężenia lenzozydu Aβ. Najsilniej działająca dawką indukującą apoptozę (8,83% komórek) było stężenie 50 μg/ml (Ryc. 45 B).

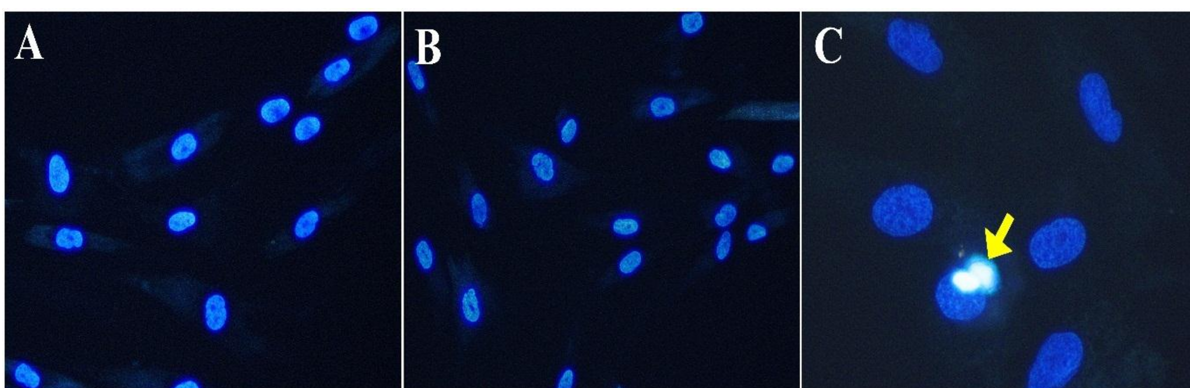
W komórkach linii HSF lenzozyd Aβ nie indukował apoptozy. Po 24 godzinnej inkubacji nastąpił wzrost ilości komórek apoptotycznych od 1,72 ± 0,20 % w kontroli do 2,36 ± 0,32 % w komórkach traktowanych badanym związkiem w stężeniu 50 μg/ml (Ryc. 46 A). Po dłuższym czasie inkubacji z flawonoidem nastąpił wzrost apoptozy do 4,37 ± 0,50% przy najwyższym stężeniu. Po 24 godzinach odnotowano niewielki wzrost komórek nekrotycznych natomiast po 48 godzinach nastąpił obniżenie ich ilości w stosunku do kontroli (Ryc. 46 B).



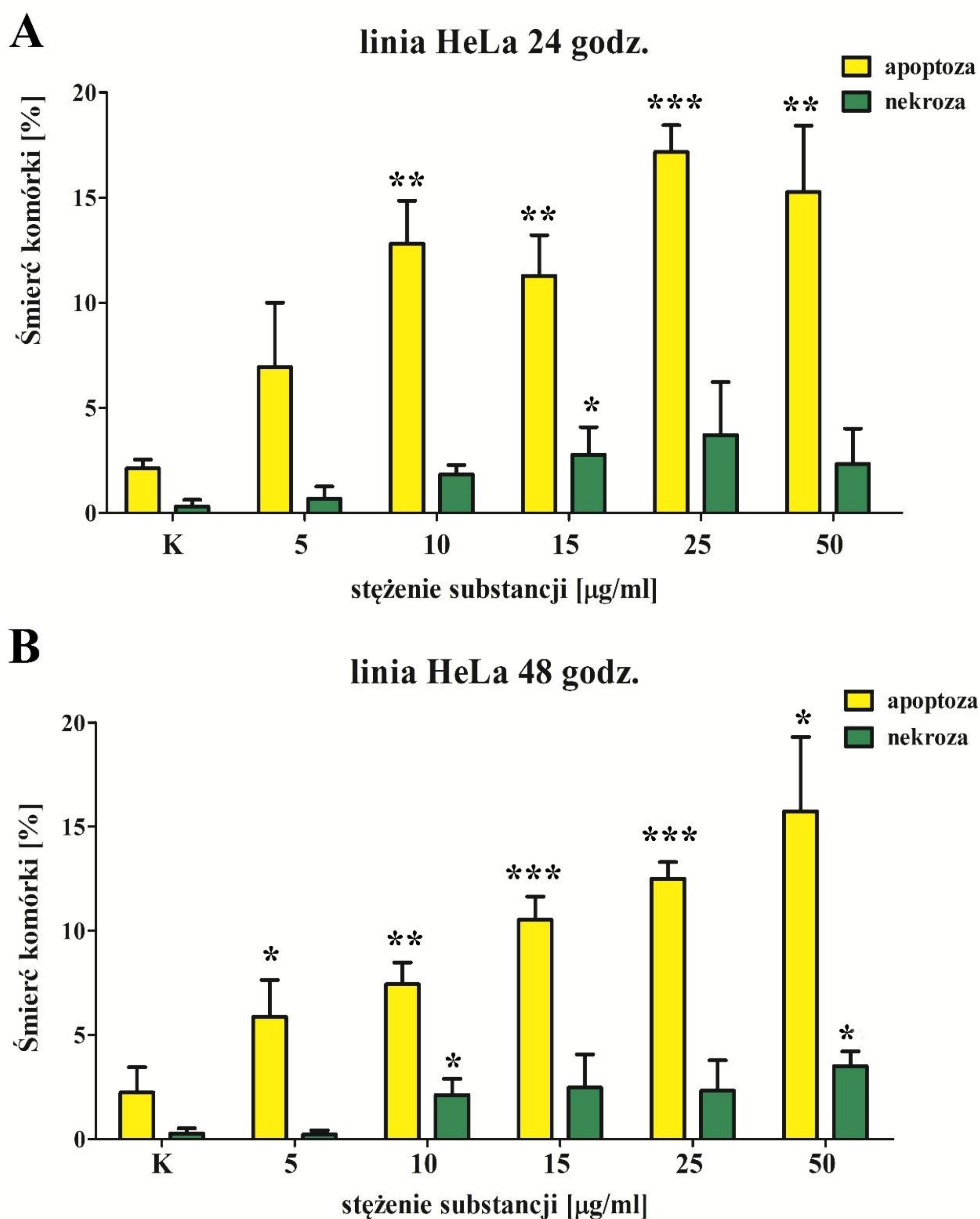
Ryc. 41. Indukcja śmierci komórek linii HeLa przez lenzozyd Aβ. Na rycinie przedstawiono obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego wykonane przy długości fali 420 nm i powiększeniu 600x (A) i 400x (B-C). Komórki niebieskie - komórki prawidłowe (żywe); komórki wykazujące intensywnie niebieskie świecenie – komórki apoptotyczne. Żółte strzałki wskazują ciałka apoptotyczne.



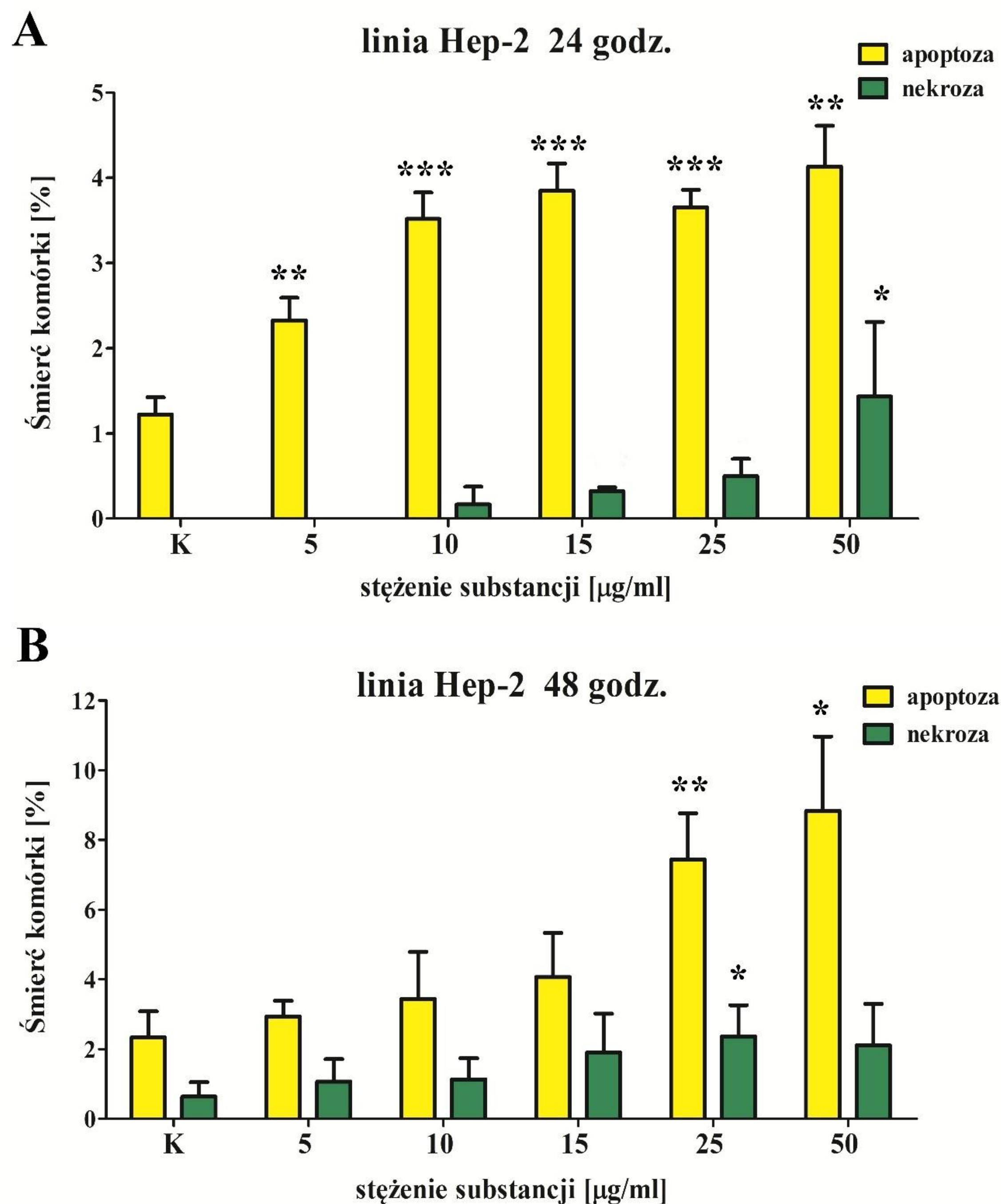
Ryc. 42. Wpływ lenzozydu Aβ na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii Hep-2. Rycina przedstawia obrazy wykonane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego przy długości fali 420 nm i powiększeniu 200x (A-B) i 400x (C). Żywe komórki wybarwione są na niebieski kolor, komórki apoptotyczne wykazują intensywną niebieską fluorescencję. Żółtymi strzałkami oznaczono ciałka apoptotyczne.



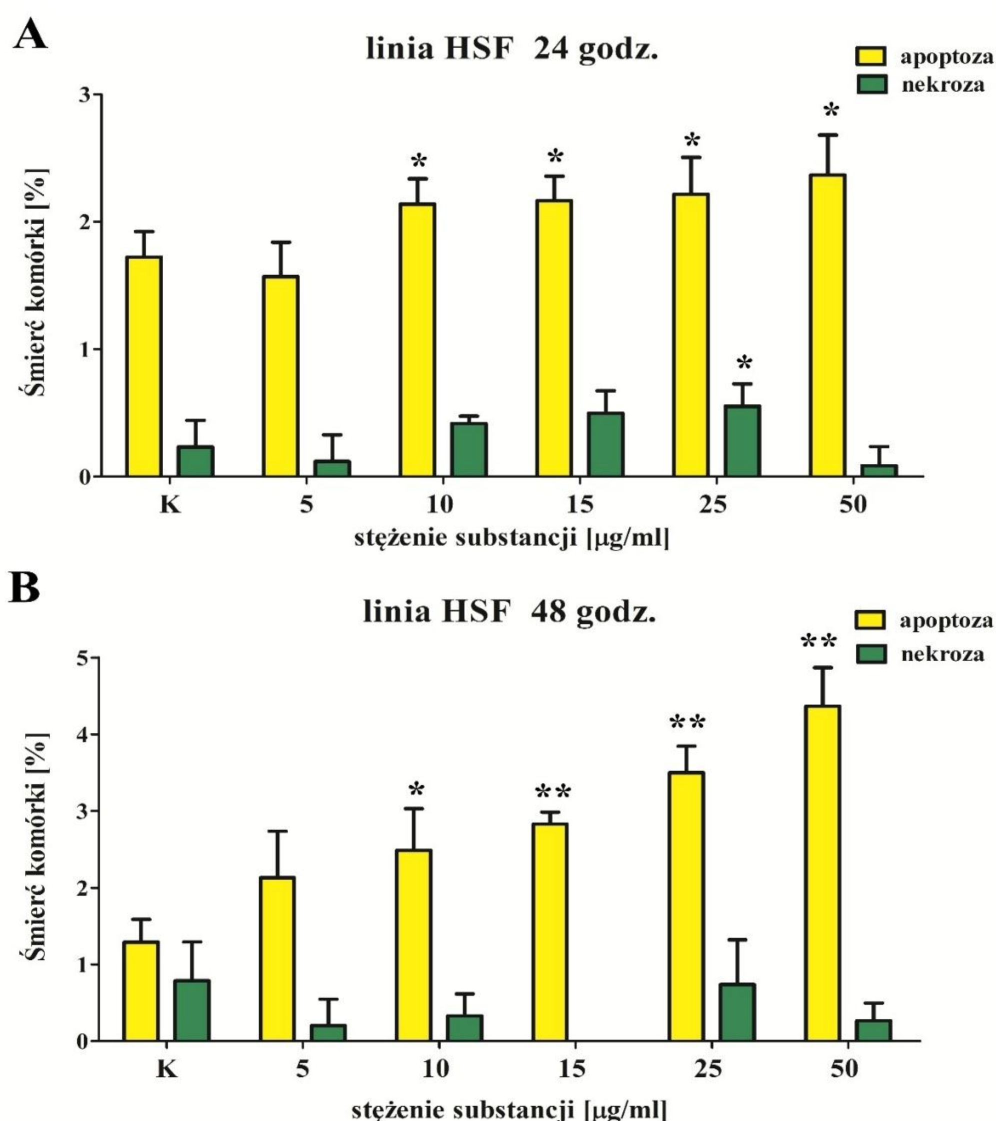
Ryc. 43. Indukcja apoptozy w komórkach linii HSF inkubowanych z lenzozydem Aβ. Na rycinie przedstawiono obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego wykonane przy długości fali 420 nm i powiększeniu 400x (A-B) i 600x (C). Komórki prawidłowe są wybarwione na niebieski kolor, komórki apoptotyczne wykazują intensywne niebieskie świecenie (żółta strzałka).



Ryc. 44. Procent komórek apoptotycznych i nekrotycznych w hodowli linii HeLa po 24-godzinnej (A) i 48-godzinnej (B) inkubacji z lenzozydem Aβ. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD, n=3, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$; test t-Studenta.



Ryc. 45. Wpływ lenzozydu Aβ na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii Hep-2 po 24-godzinnej (A) i 48-godzinnej (B) inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD, n=3, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$; test t-Studenta.



Ryc. 46. Procent komórek apoptotycznych i nekrotycznych w hodowli linii HSF po 24-godzinnej (A) i 48-godzinnej (B) inkubacji z lenzozydem Aβ. Wyniki przestawiono jako średnie ± SD, n=3, * p ≤ 0,05; ** ≤ 0,005; test t-Studenta.

4.10. Analiza komórek za pomocą cytometru przepływowego

W celu uzupełnienia i potwierdzenia danych na temat indukcji apoptozy i nekrozy przez LAβ przeprowadzono analizy techniką cytometrii przepływowej. Badane linie komórkowe: HeLa, Hep-2 oraz HSF inkubowano z flawonoidem w stężeniach 5, 10, 15, 25 i 50 µg/ml przez 24 i 48 godzin, a następnie wykonano analizy komórek wybarwionych aneksyną V sprzężoną z fluoresceiną oraz jodkiem propidionowym.

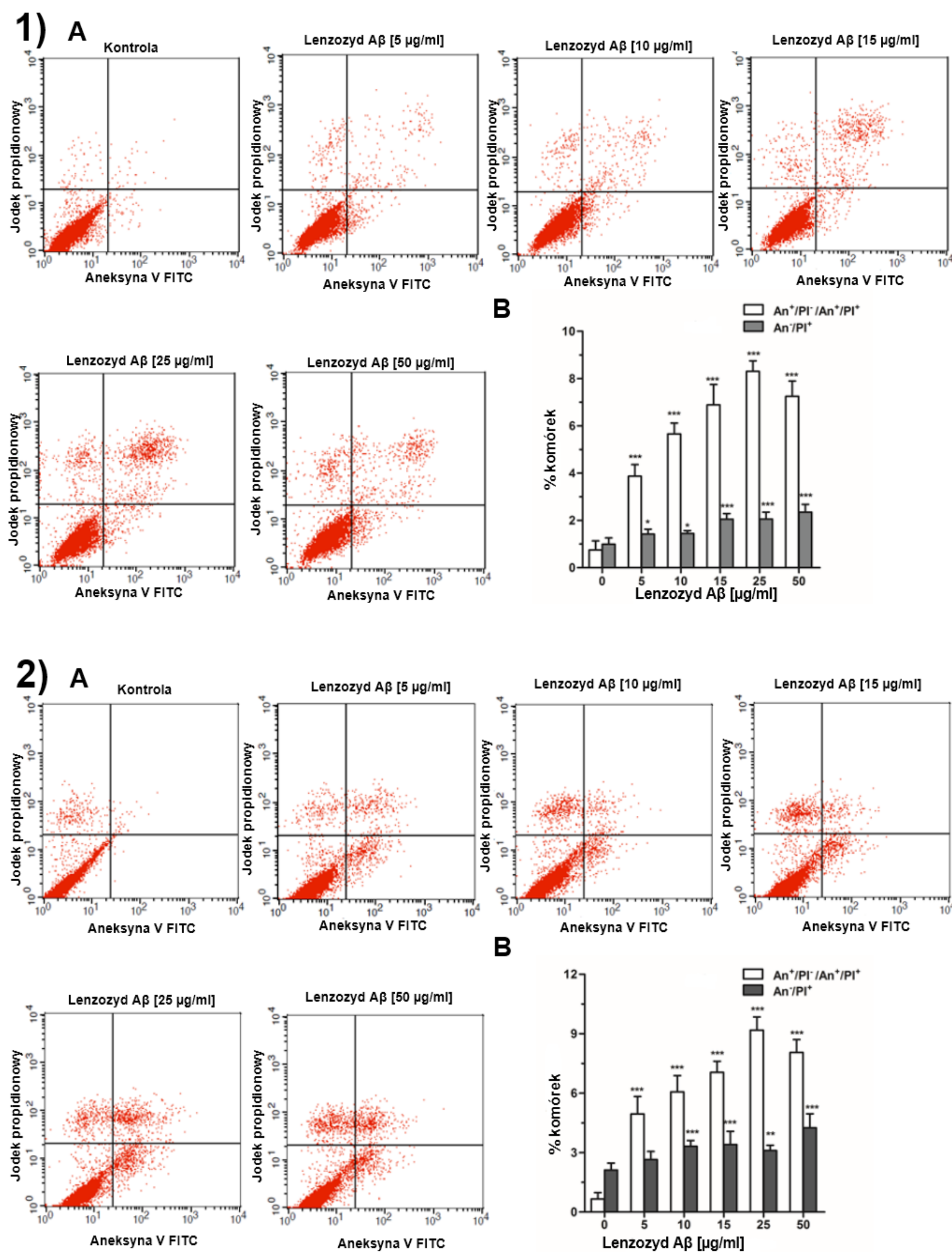
W komórkach raka szyjki macicy (HeLa) po 24 godzinach inkubacji, lenzozyd Aβ indukował apoptozę. Analiza wykazała, że ilość komórek apoptotycznych (kwadrant Q2

An+/PI+- późna apoptoza i kwadrant Q4 An+/PI- wczesna apoptoza) rosła w sposób zależny od stężenia związku. W porównaniu do komórek kontrolnych apoptoza wzrosła od 0,72 ± 0,44 % do 3,95 ± 0,39 %, 5,46 ± 0,33 %, 6,91 ± 0,97 %, 8,26 ± 0,38 % i 7,23 ±0,56 % po inkubacji odpowiednio z 5, 10, 15, 25 i 50 µg/ml lenzozydu Aβ. Najwięcej komórek apoptotycznych odnotowano w dawce 25 µg/ml. Jednocześnie lenzozyd Aβ w niewielkim stopniu indukował nekrozę komórek (kwadrant Q1 An-PI+) od 0,82 ± 0,34 % w kontroli do 2,38 ± 0,27% w stężeniu 50 µg/ml (Ryc. 47.1).

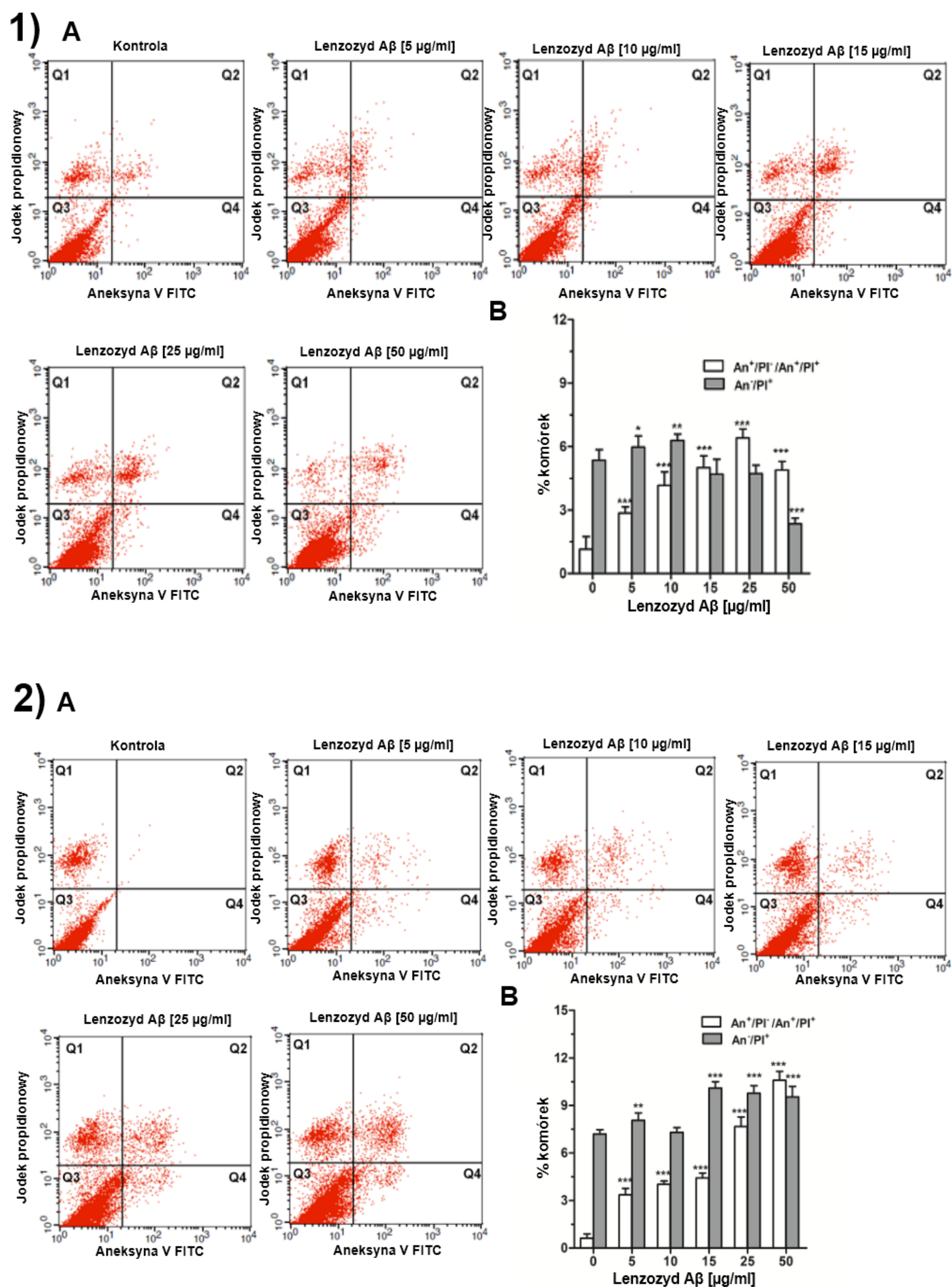
Podobny trend obserwowano po 48 godzinach inkubacji z badanym flawonoidem (Ryc. 47.2 B). Odnotowano wzrost ilości apoptozy w zależności od stężenia związku. Najsilniej działająca dawką było stężenie 25 µg/ml (9,18 ± 0,51%). Dłuższy czas inkubacji spowodował wzrost ilości komórek nekrotycznych od 2,09 ± 0,23 % do 4,44 ± 0,49 % w stężeniu 50 µg/ml.

W komórkach raka krtani (Hep-2) po 24 godzinach inkubacji również odnotowano niewielką indukcję apoptozy pod wpływem działania lenzozydu Aβ. W porównaniu do komórek kontrolnych, liczba komórek apoptotycznych wzrosła od 1,35 ± 0,47% w kontroli do 2,92 ± 0, 21% , 4,33 ± 0, 56%, 4,78 ± 0,41%, 6,36 ± 0,33% i 4,82 ± 0,36% po inkubacji z badanym związkiem odpowiednio w stężeniach 5, 10, 15, 25 i 50 µg/ml. Ponadto, dodanie flawonoidu spowodowało wzrost ilości komórek nekrotycznych w porównaniu do kontroli. Największą indukcję nekrozy odnotowano w niższych stężeniach związku (5, 10 i 15 µg/ml) (Ryc. 48.1). Po 48 godzinach inkubacji komórek raka krtani z lenzozydem Aβ nastąpił wzrost ilości komórek apoptotycznych od 0,62 ± 0,30% w kontroli do 3,36 ± 0,41%, 4,03 ±0,20%, 4,43 ± 0,31%, 7,86 ± 0,6% i 10,85 ± 0,53% w komórkach poddanych działaniu związku odpowiednio w stężeniach 5,10, 15, 25 i 50 µg/ml. Najskuteczniejszą dawką było stężenie 50 µg/ml. Badany flawonoid indukował również nekrozę. (Ryc. 48.2).

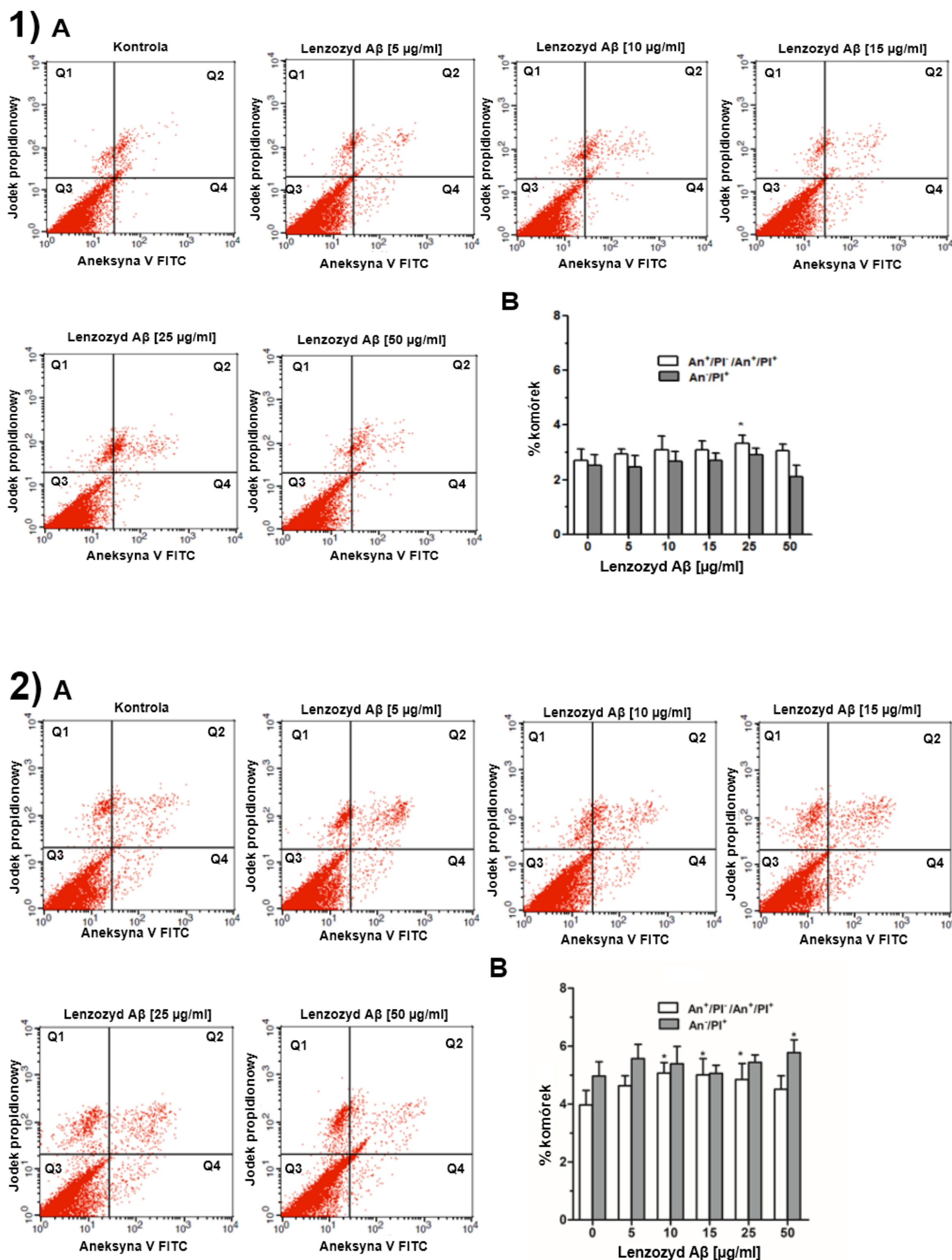
Lenzozyd Aβ w komórkach ludzkich fibroblastów skóry (linia HSF) nie indukował apoptozy. Analiza cytometryczna wykazała, odpowiednio 2,90 ± 0,18%, 3,10 ± 0,44%, 3,11 ± 0,31%, 3,42 ± 0,28 % i 3,11 ± 0,17% po 24 godzinnej inkubacji z 5, 10, 15, 25 i 50 µg/ml badanego flawonoidu. Lenzozyd Aβ nie indukował nekrozy w komórkach HSF (Ryc. 49.1). W stężeniu 50 µg/ml nastąpiło obniżenie ilości komórek nekrotycznych. Po 48 godzinnej inkubacji ludzkich fibroblastów z badanym związkiem obserwowano nieznaczny wzrost poziomu apoptozy i nekrozy w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 49.2).



Ryc. 47. Cytometryczna analiza komórek linii HeLa dla komórek kontrolnych i inkubowanych z lenzozydem Aβ przez 24 godziny (1A) i 48 godzin (2A) w stężeniach 5, 10, 15, 25,50 µg/ml. Procent komórek apoptotycznych i nekrotycznych w linii HeLa w różnych dawkach lenzozydu Aβ i kontroli po 24-godzinnej (1B) i 48-godzinnej (2B) inkubacji. n=3; * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; test Anova.



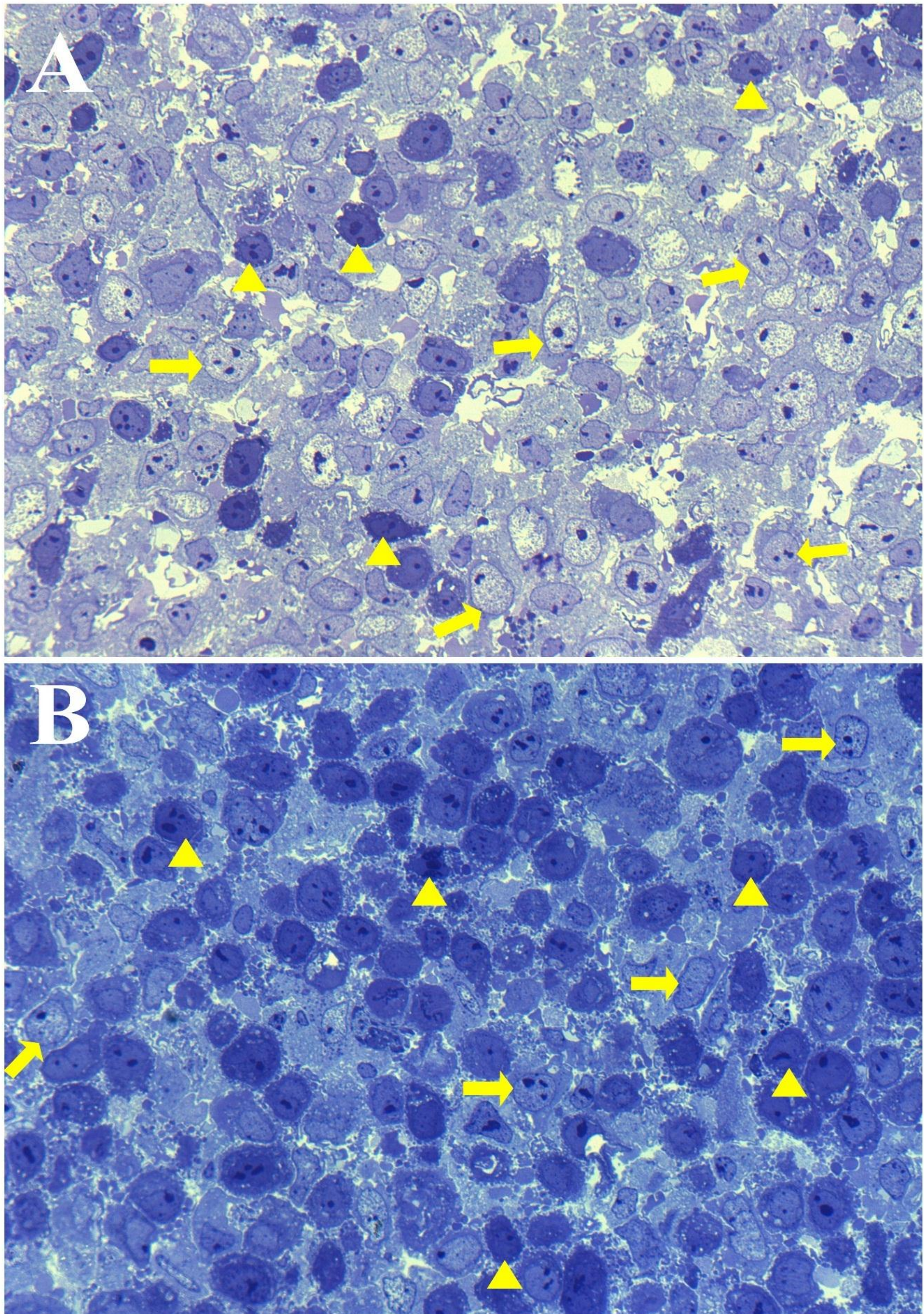
Ryc. 48. Analiza komórek linii Hep-2 przy pomocy cytometru przepływowego po 24-godzinnej (1A) i 48-godzinnej (2A) inkubacji z lenzozydem Aβ w stężeniach 5, 10, 15, 25 i 50 µg/ml. Procent komórek apoptotycznych i nekrotycznych w linii Hep-2 w różnych dawkach lenzozydu Aβ i kontroli po 24-godzinnej (1B) i 48-godzinnej (2B) inkubacji. n=3; * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; test Anova.



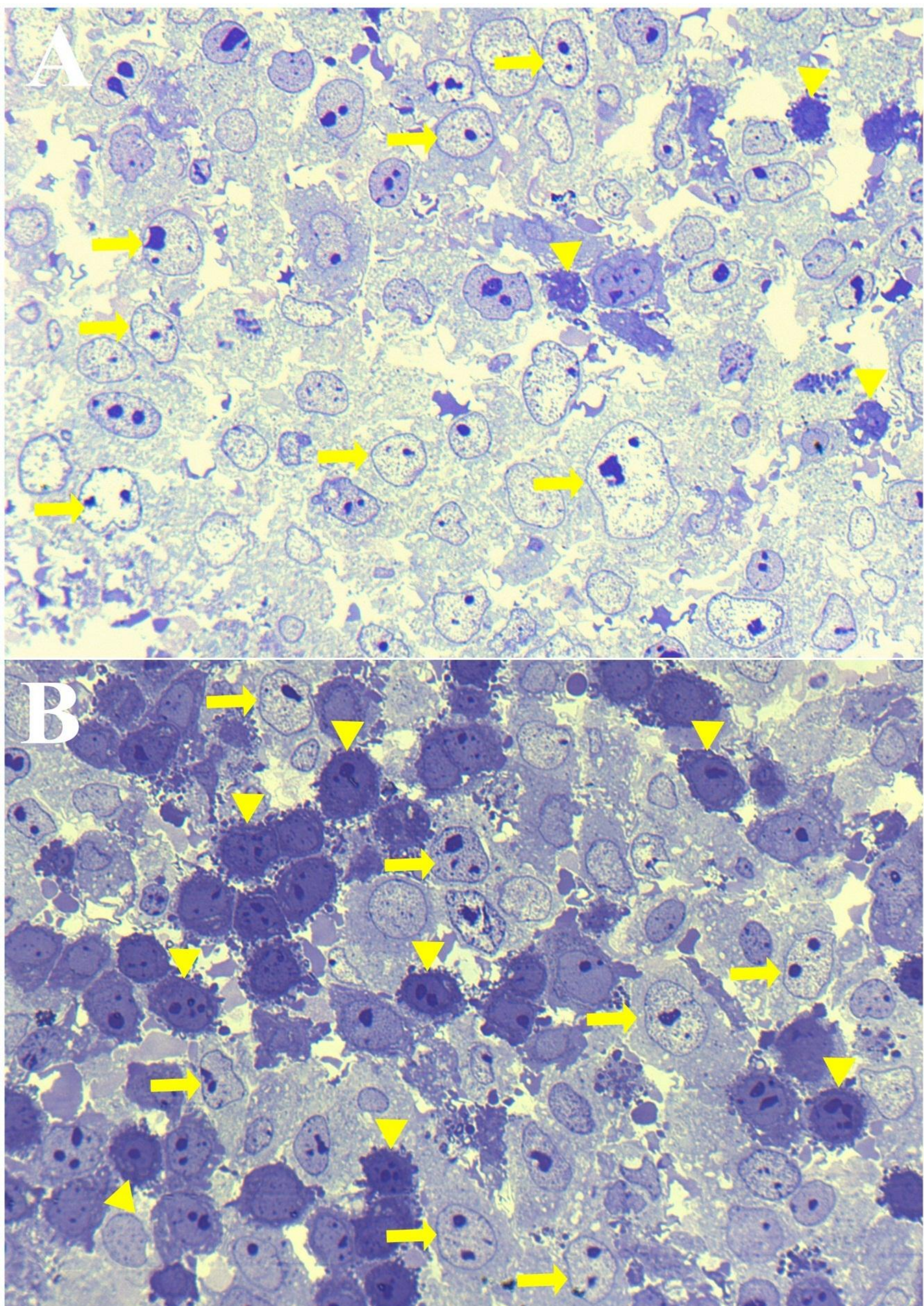
Ryc. 49. Cytometryczna analiza wpływu lenzozydu Aβ na indukcję apoptozy i nekrozy w komórkach linii HSF poddanych 24-godzinnej (1A) i 48-godzinnej (2A) inkubacji. Procent komórek apoptotycznych i nekrotycznych w linii HSF w różnych dawkach badanego flawonoidu i kontroli po 24-godzinnej (1B) i 48-godzinnej (2B) inkubacji. n=3; * $p \leq 0,1$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; test Anova.

4.11. Pomiary morfometryczne

Przeprowadzone badania miały na celu porównanie parametrów morfometrycznych komórek nowotworowych z hodowli *in vitro*. Komórki inkubowano z lenzozydem Aβ w stężeniu wynoszącym 15 µg/ml przez 24 i 48 godzin. Analiza mikroskopowa wykazała, że zarówno w przypadku linii HeLa jak i Hep-2 dodanie lenzozydu Aβ spowodowało wzrost ilości komórek ciemnych tj. charakteryzujących się jądrem ze skondensowaną chromatyną. Obserwowano również zmniejszenie ilości komórek i jąder jasnych. Pomiary, wykonano w próbach kontrolnych (Ryc. 50 A, 51 A) oraz badanych komórek z linii HeLa i Hep-2 (Ryc. 50 B, 51 B).W komórkach zmierzono następujące parametry morfometryczne: długość, szerokość, obwód, średnicę oraz pole powierzchni jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych.



Ryc. 50. Komórki raka szyjki macicy (HeLa) - próba kontrolna (A) i komórki HeLa inkubowane z lenzozydem Aβ (B) (pow. 630x). Żółte strzałki wskazują komórki jasne, natomiast żółte groty komórki ciemne.



Ryc. 51. Preparaty półcienkie komórek raka krtani (Hep-2) - próba kontrolna (A) i komórki Hep-2 inkubowane z lenzozydem Aβ (B) (pow. 630x). Żółte strzałki wskazują komórki jasne, natomiast żółte groty komórki ciemne.

4.11.1. Długość komórek i ich jąder z hodowli HeLa i Hep-2 *in vitro*

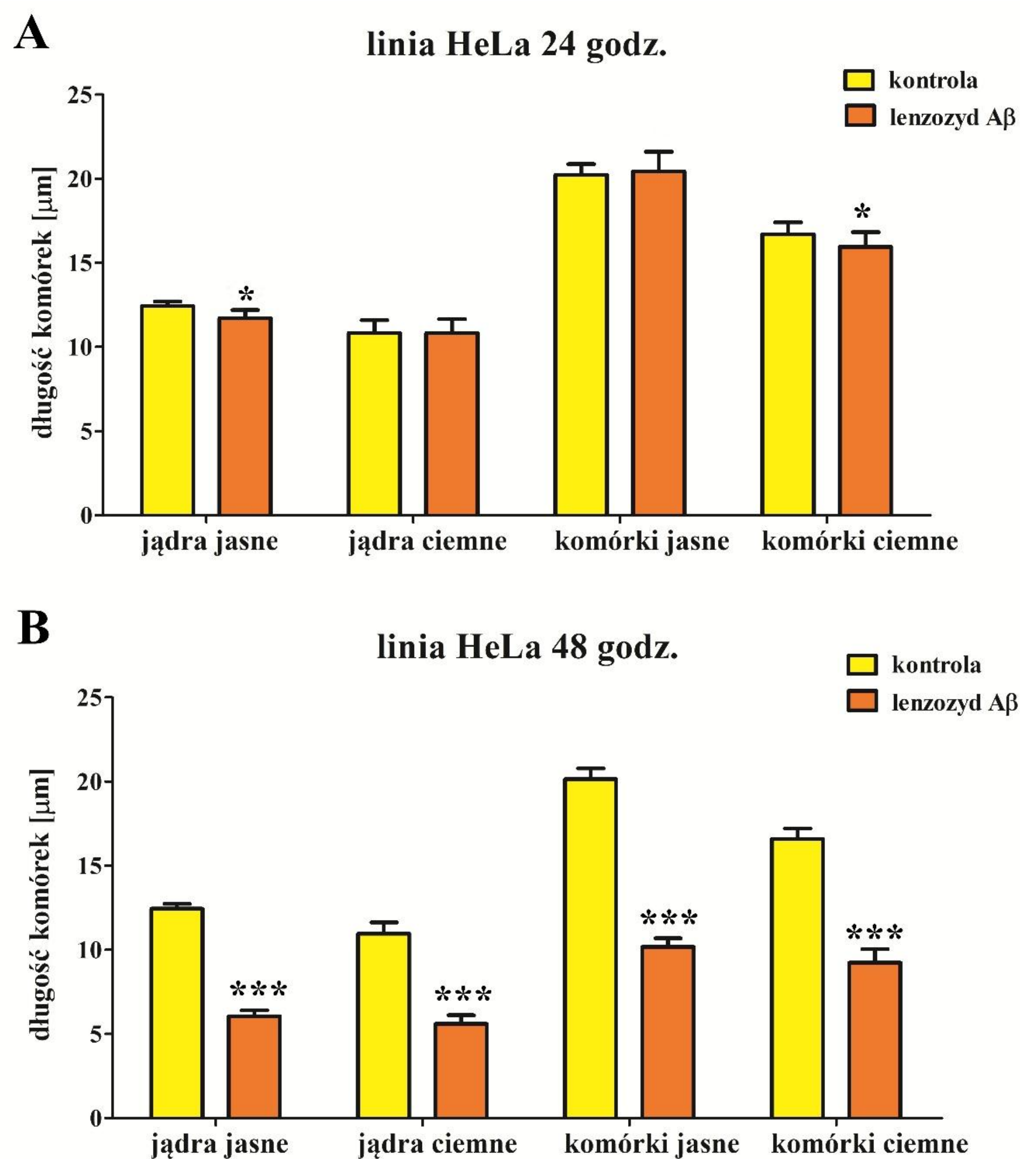
Jednym z parametrów jaki mierzono w badaniu była długość komórek i jąder. W komórkach linii HeLa inkubowanych z lenzozydem Aβ przez 24 godziny średnia długość komórek ciemnych i jąder jasnych była nieznacznie mniejsza niż ich średnia długość w próbach kontrolnych. Długość komórek ciemnych w próbie kontrolnej wynosiła 16,58 μm, natomiast w próbie badanej zmniejszyła się o 2,7 % i wynosiła 16,14 μm. Z kolei średnia długość jąder jasnych w kontroli wynosiła 12,44 μm, a w próbie badanej 11,77 μm. Oznacza to, że się zmniejszyła o 5,4%. Długość jąder ciemnych nie ulegała znaczącej zmianie. W próbie kontrolnej wynosiła 10,96 μm, a po inkubacji z flawonoidem zmniejszyła się do 10,7 μm. W wyniku działania lenzozydu zmianie uległa również średnia długość komórek jasnych z 20,14 μm w kontroli do 20,77 μm w próbie badanej (Ryc. 52 A).

Po 48 godzinnej inkubacji z lenzozydem Aβ, obserwowano znaczące zmniejszenie długości komórek i jąder w stosunku do kontroli. Długość komórek jasnych w próbie kontrolnej wynosiła 20,1 μm, natomiast w próbie badanej zmniejszyła się o 49,3% i wynosiła 10,2 μm. Podobną zmianę obserwowano w komórkach ciemnych traktowanych flawonoidem. Ich średnia długość (9,13 μm) zmniejszyła się o 44,6% w porównaniu do średniej długości komórek (16,57 μm) z prób kontrolnych. Taką samą tendencję odnotowano w przypadku pomiaru jader. Jądra jasne inkubowane z lenzozydem Aβ miały zmniejszoną długość o 50,8%, a jądra ciemne o 48,6% w stosunku do długości odpowiednich jąder komórek z hodowli kontrolnej (Ryc. 52 B).

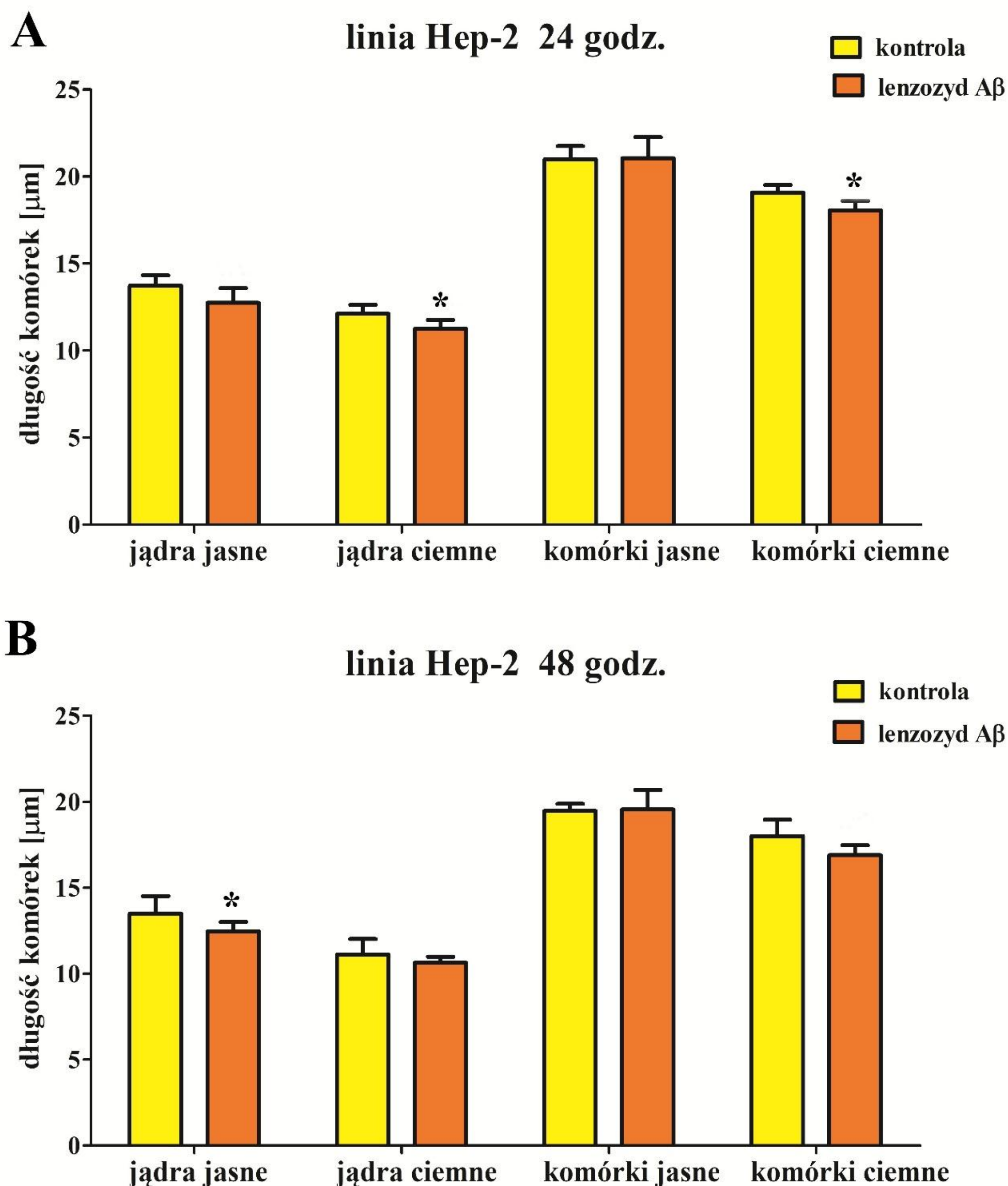
W komórkach linii Hep-2 zarówno po 24 jak i 48 godzinnej inkubacji z badanym związkiem, obserwowano niewielkim zmniejszenie długości zarówno komórek ciemnych jak i jąder jasnych i ciemnych. W komórkach ciemnych, w próbie kontrolnej średnia długość wynosiła 19,07 μm, natomiast w próbie badanej traktowanej lenzozydem Aβ przez 24 godziny długość wynosiła 18,05 μm czyli zmniejszyła się o 5,4%. W jądrach ciemnych po inkubacji z flawonoidem średnia długość zmniejszyła się o 7,1%. Taką samą tendencję obserwowano również w jądrach jasnych gdzie średnia długość wynosiła 13,73 μm natomiast w próbie badanej zmniejszyła się o 7,2 % i wynosiła 12,74 μm. Długość komórek jasnych pozostała bez zmian (Ryc. 53 A).

Po dłuższym czasie inkubacji obserwowano podobne zmiany w długości komórek i jąder. Średnia długość komórek ciemnych oraz jąder ciemnych i jasnych traktowanych

lenzozydem Aβ uległa zmniejszeniu w porównaniu do kontroli odpowiednio o 4,6%, 1,4% i 7,7% . Długość komórek jasnych nie uległa zmianie (Ryc. 53 B).



Ryc. 52. Porównanie długości jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych w komórkach (kontrolnych i poddanych działaniu lenzozydu Aβ) z hodowli HeLa. A – 24-godzinna inkubacja, B – 48-godzinna inkubacja. n =20; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$; test T-studenta.



Ryc. 53. Długość jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych w komórkach (kontrolnych i traktowanych lenzozydem Aβ) z hodowli Hep-2. A - 24-godzinna inkubacja, B – 48-godzinna inkubacja. n=20; * $p \leq 0{,}05$; test t-Studenta.

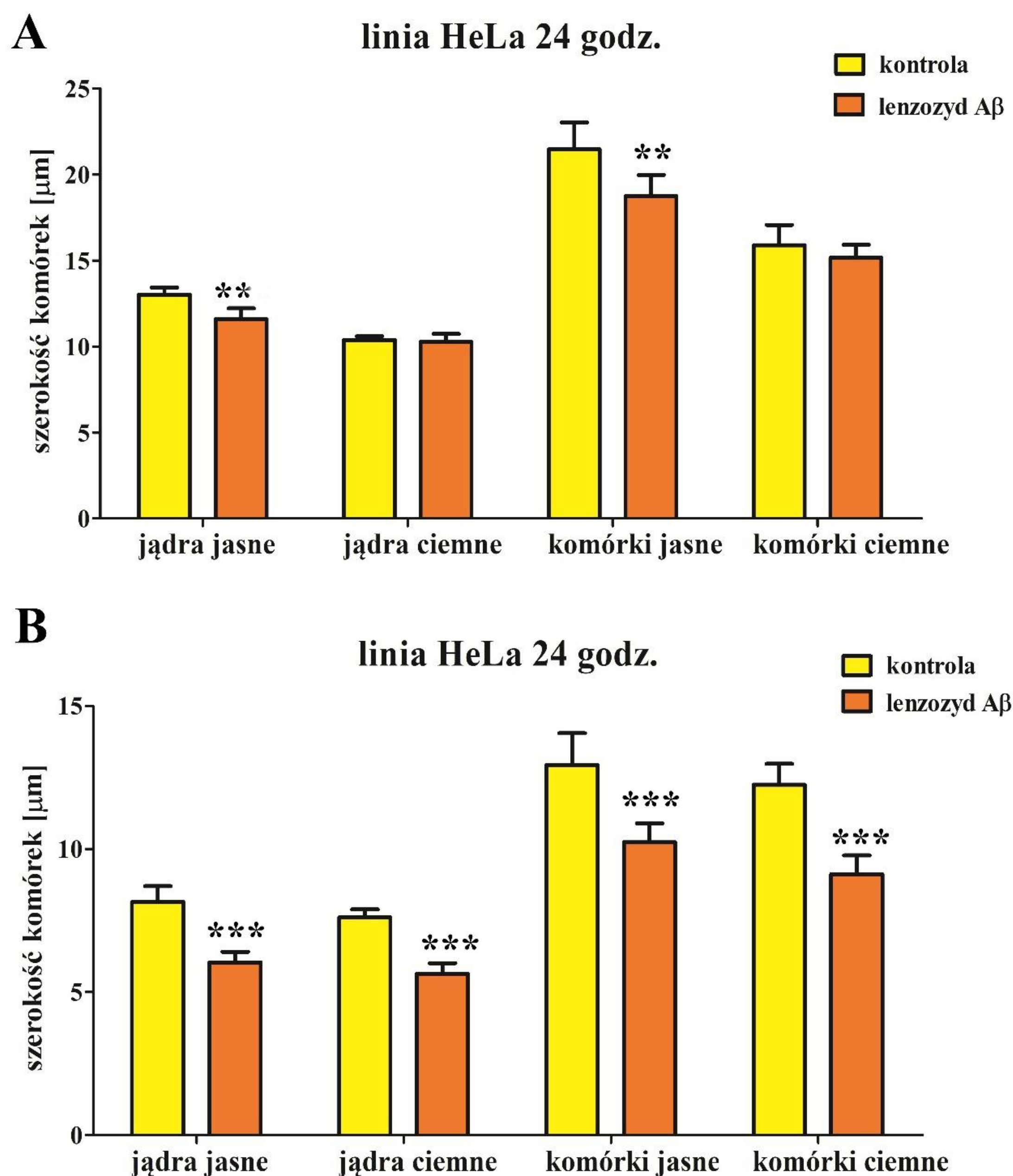
4.11.2. Szerokość komórek i jąder z hodowli HeLa i Hep-2 *in vitro*

Kolejnym analizowanym parametrem była szerokość badanych komórek. Komórki HeLa traktowane lenzozydem Aβ przez 24 godziny charakteryzowały się zmniejszoną szerokością zarówno komórek jasnych i ciemnych, jak również jąder jasnych. Średnia

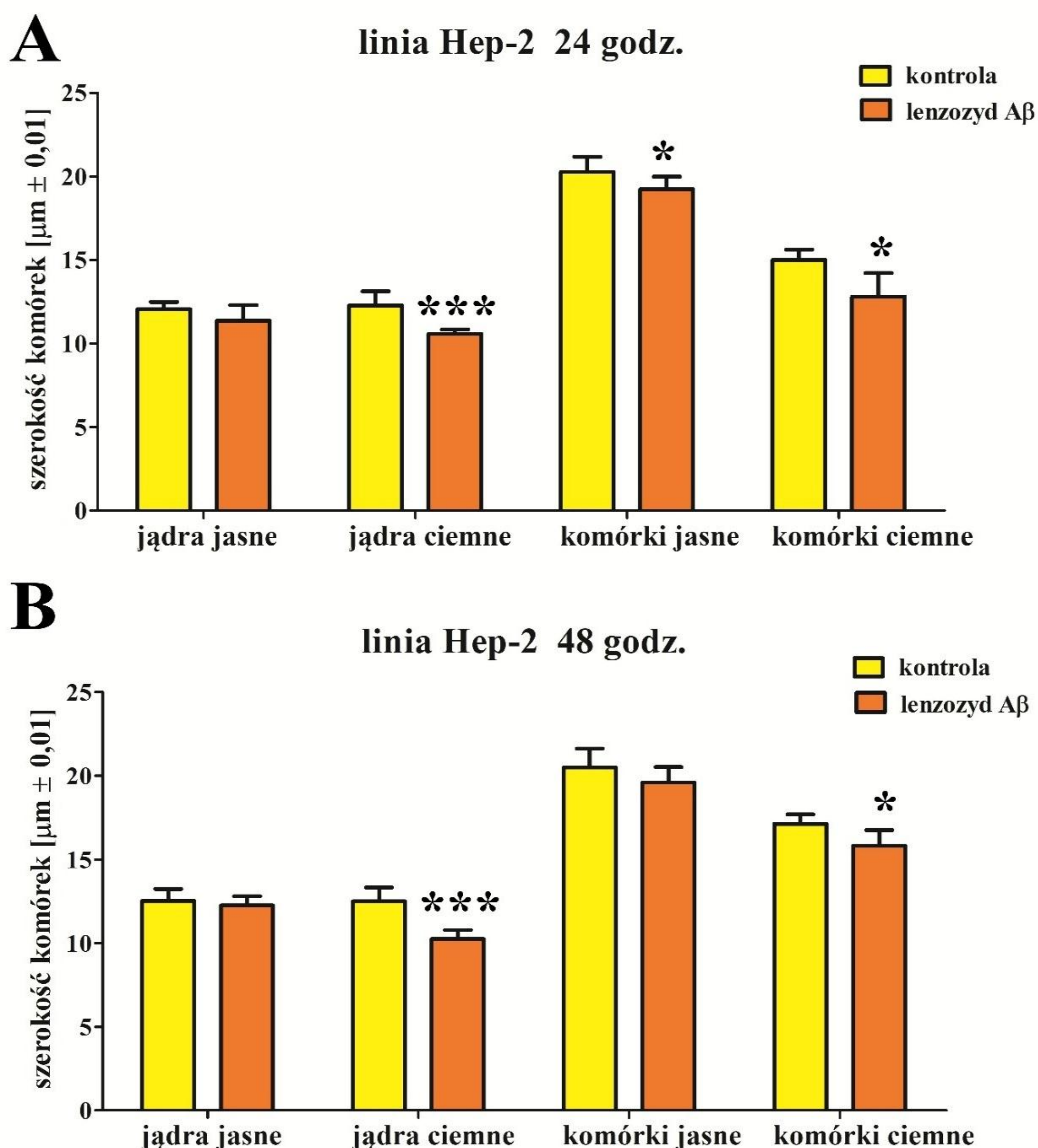
szerokość komórek jasnych w próbie kontrolnej wynosiła 21,47 µm, natomiast w próbie badanej uległa zmniejszeniu o 12,7% i wynosiła 18,75 µm. Średnia szerokość komórek ciemnych poddanych działaniu badanego flawonoidu wynosiła 15,17 µm i w porównaniu do średniej szerokość w komórek kontrolnych (15,89 µm) zmniejszyła się o 4,5%. Z kolei szerokość jąder jasnych zmniejszyła się o 10,9 % w stosunku do kontroli. Nie odnotowano zmian średniej szerokości jąder ciemnych po 24 godzinnej inkubacji z lenzozydem Aβ (Ryc. 54 A).

W przypadku dłuższego czasu inkubacji (48 godzin) obserwowano znaczące zmniejszenie szerokości komórek jasnych i ciemnych oraz jąder jasnych i ciemnych. Szerokość komórek ciemnych w próbie kontrolnej wynosiła 12,4 µm, natomiast w wyniku działania flawonoidu zmniejszyła się do 9,12 µm (o 26,5%). Podobną tendencję obserwowano w komórkach jasnych. Ich średnia szerokość zmniejszyła się o 17,3%. Z kolei średnia szerokość jąder ciemnych po inkubacji z lenzozydem Aβ wynosiła 5,64 µm i w porównaniu do kontroli (7,61 µm) zmniejszyła się o 25,9%. Zmniejszeniu uległa również szerokość jąder jasnych (o 25,7% w stosunku do próby kontrolnej) (Ryc. 54 B).

Lenzozyd Aβ zmniejszał również szerokość zarówno komórek jak i jąder w hodowlach linii Hep-2. Po 24 godzinnej inkubacji obserwowano zmniejszenie szerokości komórek ciemnych i jasnych w porównaniu do kontroli odpowiednio o 14,7% i 5,1%. W jądrach ciemnych w próbie kontrolnej średnia szerokość wynosiła 12,28 µm a w komórkach traktowanych badanym związkiem średnia szerokość wynosiła 10,59 µm. Oznacza to, że zmniejszyła się o 13,8%. Z kolei średnia szerokość jąder jasnych zmniejszyła się o 5,8% (Ryc. 55 A). Po 48 godzinach obserwowano podobną tendencję. Pod wpływem działania lenzozydu Aβ średnia szerokość komórek jasnych zmniejszyła się o 4,5% w stosunku do kontroli. W komórkach ciemnych również obserwowano zmniejszenie szerokości z 17,13 µm w próbie kontrolnej do 15,85 µm w próbie badanej. Podobnie było w przypadku jąder ciemnych. Ich średnia szerokość pod wpływem flawonoidu uległa zmniejszeniu o 17,9%. Lenzozyd Aβ nie zmieniał szerokości jąder jasnych w komórkach raka krtani (Ryc. 55 B).



Ryc. 54. Szerokość jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych w komórkach (kontrolnych i traktowanych lenzozydem Aβ) z hodowli HeLa. A – po 24-godzinnej inkubacji, B- po 48-godzinnej inkubacji. n=20; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$; test t-Studenta.



Ryc. 55. Wpływ lenzozydu Aβ na szerokość jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych (kontrolnych i traktowanych lenzozydem Aβ) z hodowli Hep-2. A – 24-godzinna inkubacja, B – 48-godzinna inkubacja. n=20; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$; test t-Studenta.

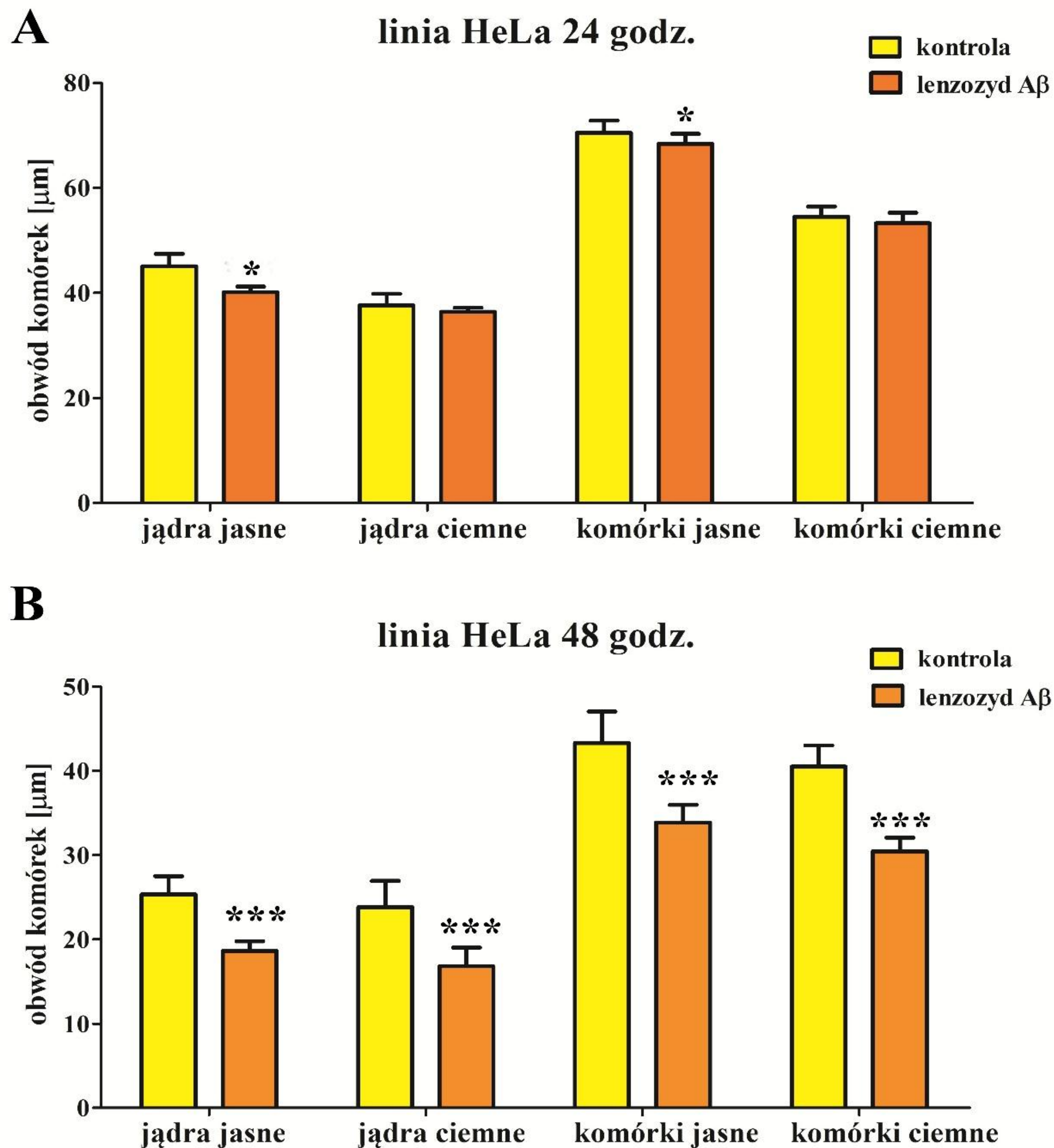
4.11.3. Obwód komórek i jąder z hodowli HeLa i Hep-2 *in vitro*

W przeprowadzonych badaniach, mierzono także obwód komórek oraz ich jąder. W komórkach linii HeLa inkubowanych z lenzozydem Aβ przez 24 godziny średni obwód był mniejszy, niż średni obwód komórek kontrolnych (Ryc. 56 A). Średni obwód komórek jasnych w próbie kontrolnej wynosił 70,49 µm, natomiast w próbie badanej zmniejszył się

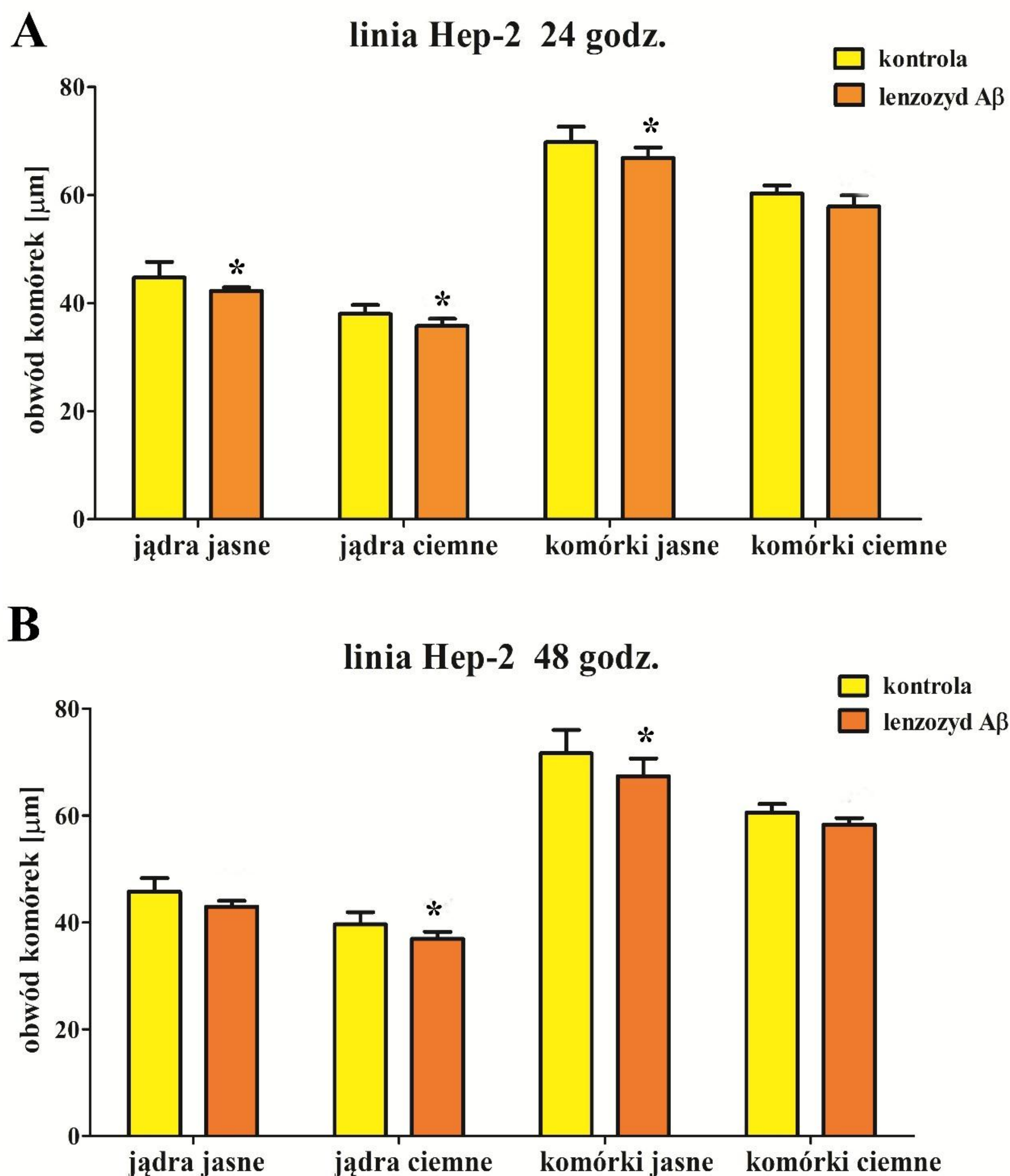
o 3% i wynosił 68,39 µm. Podobną zmianę obserwowano w komórkach ciemnych. W komórkach traktowanych flawonoidem obwód zmniejszył się o 2,3% w porównaniu do kontroli. Taką samą tendencję odnotowano w przypadku pomiaru obwodu jąder. Jądra jasne inkubowane z lenzozydem Aβ miały zmniejszony obwód o 11,1%, a jądra ciemne o 3,3% w stosunku do obwodu jąder komórek z hodowli kontrolnej (Ryc. 56 A).

Po 48 godzinnej inkubacji średni obwód komórek i jąder uległ zmniejszeniu. W komórkach jasnych w kontroli średni obwód wynosił 42,95 µm. Pod wpływem działania lenzozydu Aβ zmniejszył się o 21,9%. Podobną zmianę obserwowano w komórkach ciemnych. W komórkach inkubowanych flawonoidem obwód zmniejszył się o 24,7% w porównaniu do kontroli. Zmniejszenie obwodu obserwowano również w jądrach jasnych i ciemnych. Jądra jasne inkubowane z lenzozydem Aβ miały zmniejszony obwód o 26,5%, a jądra ciemne o 29,4% w stosunku do obwodu jąder komórek z hodowli kontrolnej (Ryc. 56 B).

Lenzozyd Aβ zmienił w niewielkim stopniu obwód komórek z linii Hep-2. Po 24 godzinach inkubacji z badanym związkiem średni obwód komórek i jąder uległ zmniejszeniu. Obwód komórek jasnych w próbie kontrolnej wynosił 69,8 µm , natomiast w próbie badanej 66,9 µm. Oznacza to, że w komórkach poddanych działaniu flawonoidu, obwód zmniejszył się o 4,2% w stosunku do kontroli. W komórkach ciemnych traktowanych flawonoidem obwód zmniejszył się o 3,8% w porównaniu do kontroli. Podobne zmiany odnotowano w przypadku pomiaru obwodu jąder. Jądra jasne inkubowane z lenzozydem Aβ miały zmniejszony obwód o 5,6%, a jądra ciemne o 5,8% w stosunku do obwodu jąder komórek z hodowli kontrolnej (Ryc. 57 A). Po 48 godzinnej inkubacji również obserwowano zmniejszenie obwodu zarówno komórek jak i jąder. Średni obwód komórek jasnych i ciemnych zmniejszył się w porównaniu do kontroli odpowiednio o 5,9% i 3,8%. W jądrach ciemnych próby kontrolnej średni obwód wynosił 39,63 µm, natomiast po inkubacji z lenzozydem Aβ wynosił 36,91µm. Oznacza to, że zmniejszył się o 6,9%. Z kolei średni obwód jąder jasnych zmniejszył się z 45,73 µm w kontroli do 42,94 µm w próbie badanej (Ryc. 57 B).



Ryc. 56. Obwód jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych (kontrolnych i poddanych działaniu lenzozydu Aβ) z hodowli HeLa. A - 24-godzinna inkubacja, B – 48-godzinna inkubacja. n=20; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$; test t-Studenta.



Ryc. 57. Porównanie zmian obwodu jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych (kontrolnych i traktowanych lenzozydem Aβ) z hodowli Hep-2. A – 24-godzinna inkubacja, B – 48-godzinna inkubacja. n=20; * $p \leq 0{,}05$; test t-Studenta.

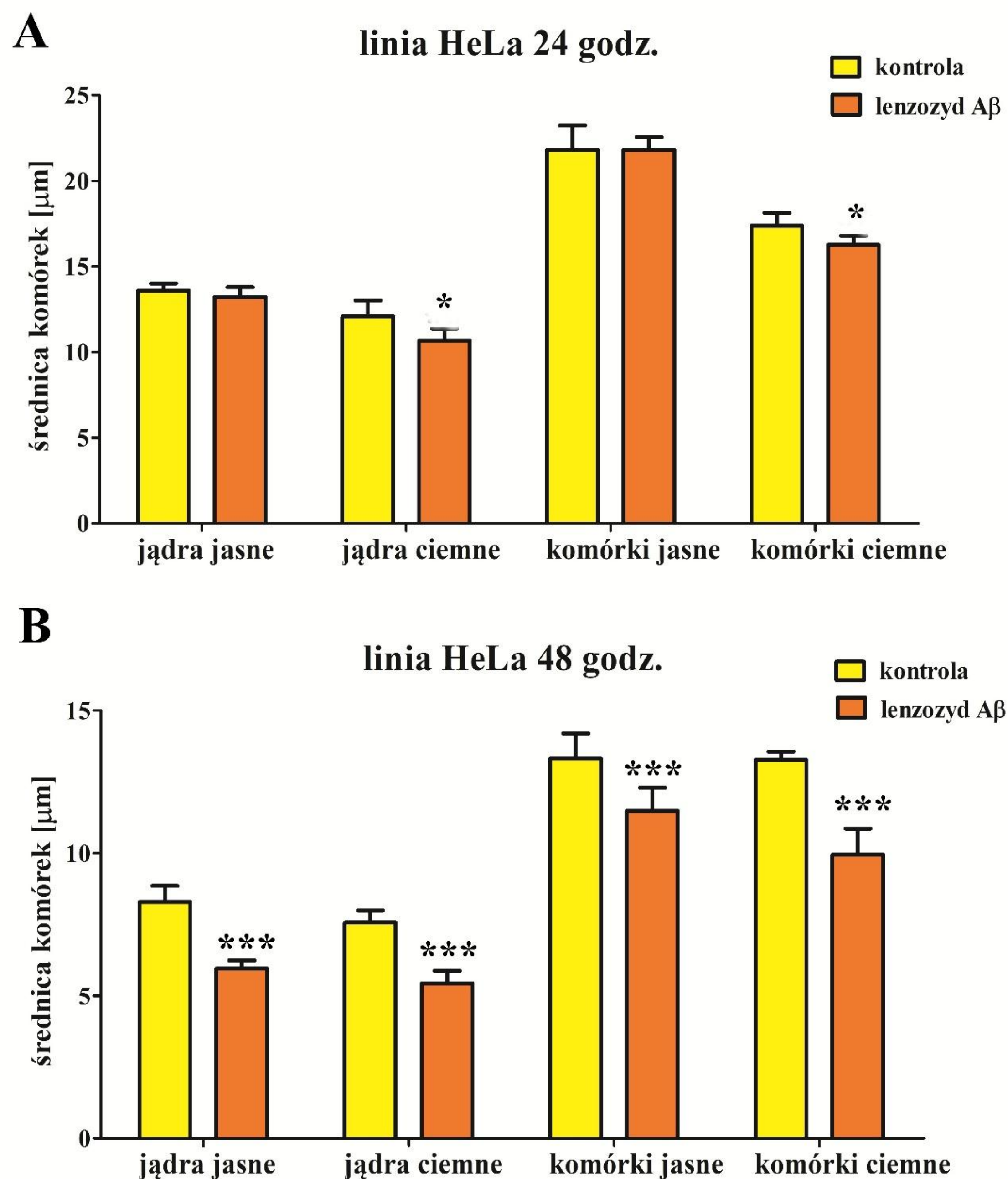
4.11.4. Średnica komórek i jąder z hodowli Hela i Hep-2 *in vitro*

Kolejnym parametrem mierzonym w badaniach była średnica komórek i jąder z hodowli *in vitro*. W komórkach linii HeLa inkubowanych przez 24 godziny z flawonoidem

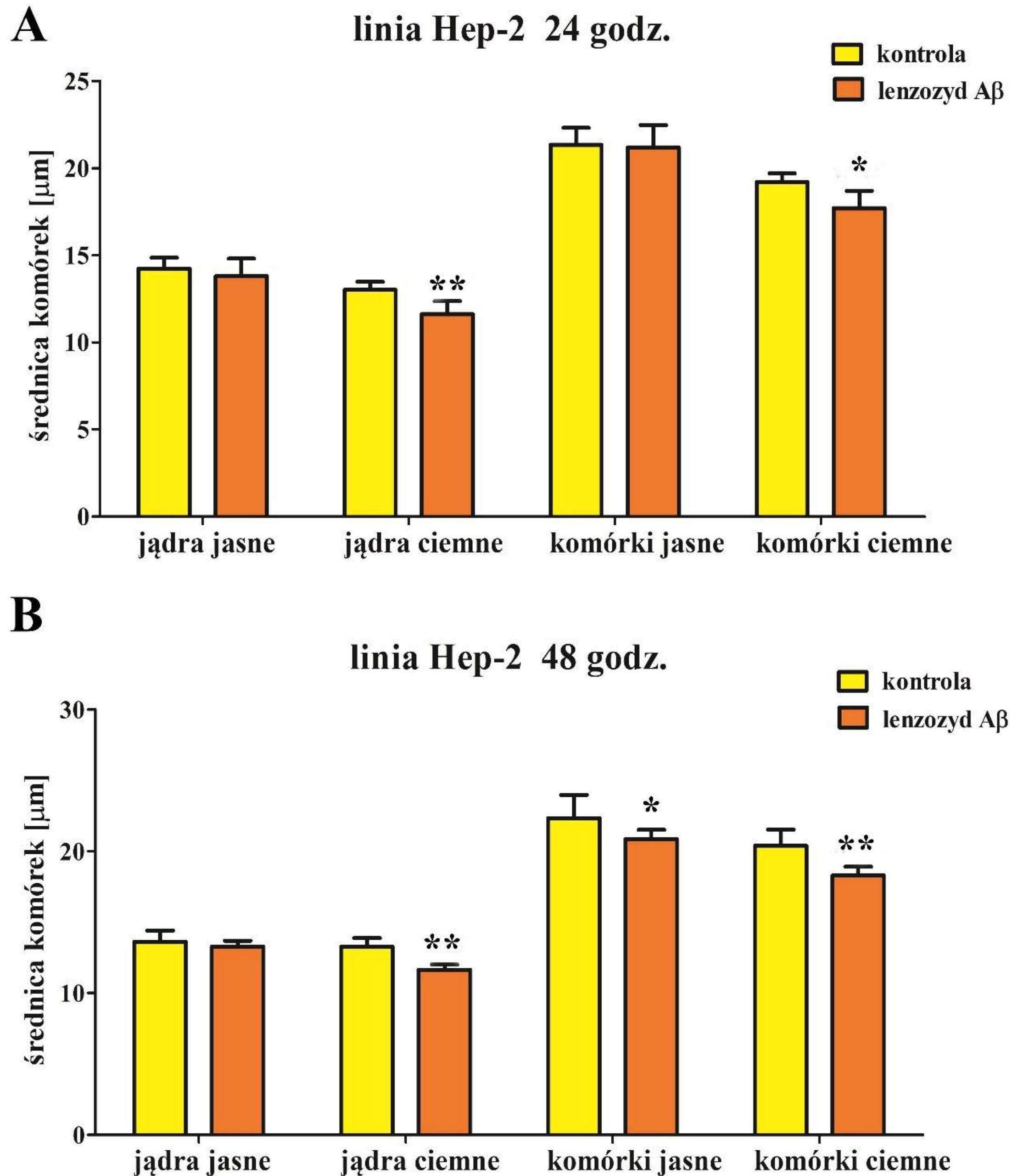
wykazano, zmniejszenie średnicy komórek ciemnych i jąder ciemnych w stosunku do hodowli kontrolnej. W komórkach ciemnych, w próbie kontrolnej średnia średnica wynosiła 17,38 µm, natomiast w próbie badanej traktowanej lenzozydem Aβ przez 24 godziny średnica wynosiła 16,76 µm czyli zmniejszyła się o 4,1%. Z kolei średnica jąder ciemnych zmniejszyła się o 8,3% w stosunku do kontroli. Nie odnotowano zmian średnicy komórek i jąder jasnych (Ryc. 58 A).

Po 48 godzinach inkubacji średnia średnica komórek jasnych traktowanych lenzozydem Aβ wynosiła 11,46 µm, natomiast średnica komórek z próby kontrolnej 13,33 µm. Oznacza to, że średnica komórek badanych uległa zmniejszeniu o 14,1%. Podobną tendencję odnotowano dla komórek ciemnych, w których średnia średnica próby badanej wynosiła 9,94 µm, zaś próby kontrolnej 13,27 µm. A więc, średnica komórek inkubowanych z flawonoidem zmniejszyła się o 24,1%. Podobne zmiany zaobserwowano w przypadku mierzonej średnicy jąder. Jądra jasne komórek poddawanych działaniu lenzozydu Aβ miały zmniejszoną średnicę o 28,3%, ponieważ średnia średnica próby badanej wynosiła 5,94 µm, za to w próbie kontrolnej 8,29 µm. W jądrach ciemnych średnia średnica próby badanej wynosiła 5,43 µm, podczas gdy, w próbie kontrolnej 7,56 µm. Wskazuje to na obniżenie średnicy jąder ciemnych w komórkach traktowanych flawonoidem o 28,2% w stosunku do komórek hodowli kontrolnej (Ryc. 58 B).

W przypadku linii Hep-2 również nastąpiło zmniejszenie średnicy komórek ciemnych oraz jąder jasnych i ciemnych traktowanych flawonoidem. Średnica komórek jasnych nie uległa zmniejszeniu. Średnica komórek ciemnych w próbie kontrolnej wynosiła 19,2 µm, a w próbie badanej zmniejszyła się o 7,9% i wynosiła 17,7 µm. Podobne wyniki otrzymano mierząc średnice jąder ciemnych, która zmniejszyła się o 11,9% w stosunku do kontroli. Jądra jasne komórek poddanych działaniu związku miały zmniejszoną średnicę o 3,1% (Ryc. 59 A). Podobne wyniki otrzymano w przypadku komórek linii Hep-2 traktowanych lenzozydem Aβ przez 48 godzin. Średnia średnica komórek jasnych i ciemnych pod wpływem badanego flawonoidu zmniejszyła się odpowiednio o 6,6% i 10,3%. W jądrach ciemnych, w próbie kontrolnej średnia średnica wynosiła 13,26 µm, natomiast w próbie badanej traktowanej lenzozydem Aβ przez 48 godzin średnica wynosiła 11,65 µm czyli zmniejszyła się o 12,1%. Z kolei w przypadku jąder jasnych nie obserwowano znaczących zmiany średnicy (Ryc. 59 B).



Ryc. 58. Wpływ lenzozydu Aβ na średnicę jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych z hodowli HeLa. A – 24-godzinna inkubacja, B – 48-odzinna inkubacja. n=20; * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$; test t-Studenta.



Ryc. 59. Porównanie zmian średnicy jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych (kontrolnych i poddanych działaniu lenzozydu Aβ). A – 24-godzinna inkubacja , B – 48-godzinna inkubacja. n=20; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; test t-Studenta.

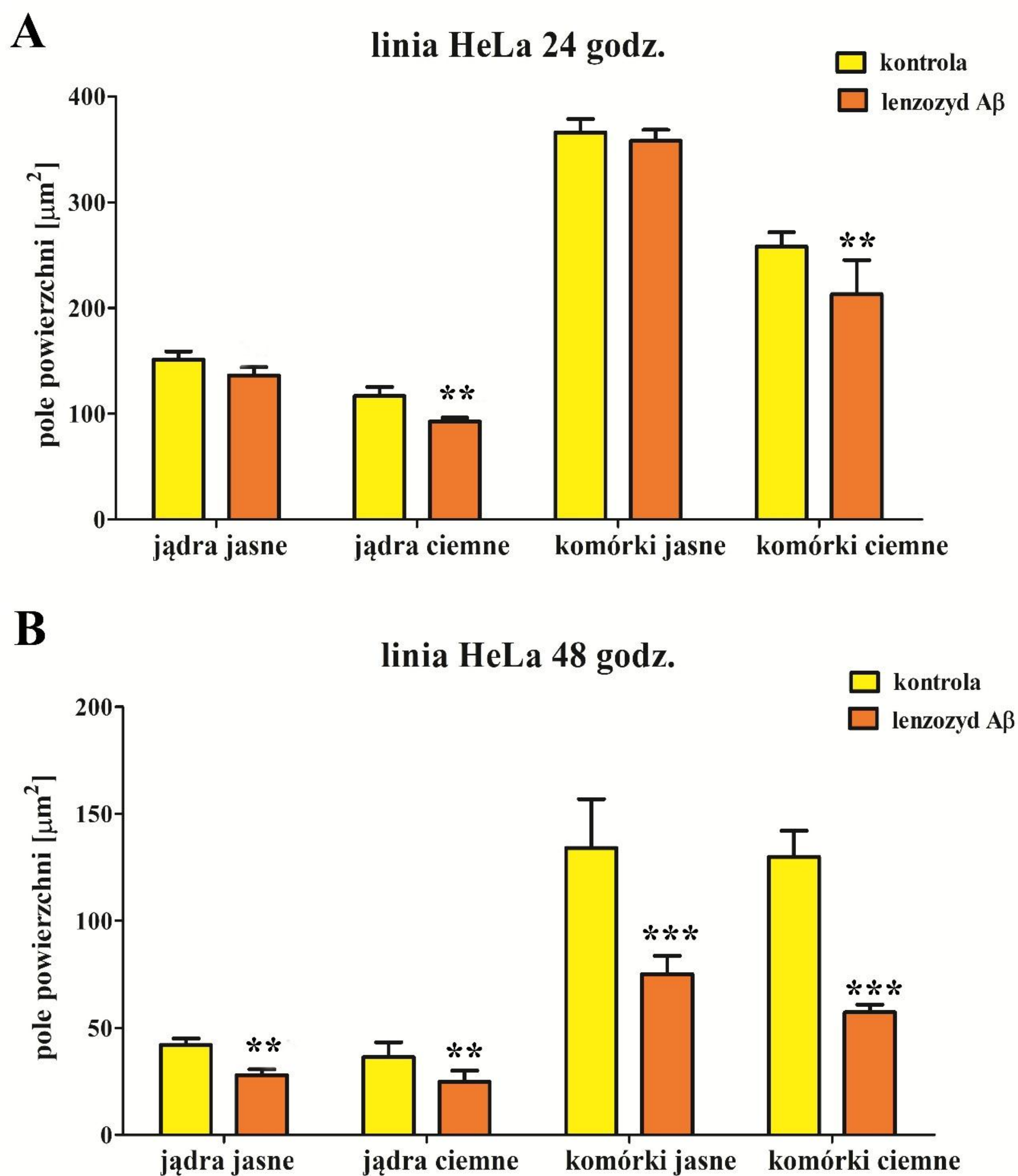
4.11.5. Pole powierzchni komórek i jąder z hodowli HeLa i Hep-2 *in vitro*

W badaniach przeprowadzono również pomiary wielkości pola powierzchni, zarówno komórek jak i jąder jasnych i ciemnych. Wykazano zmniejszenie tego parametru w komórkach linii HeLa poddanych działaniu lenzozydu Aβ.

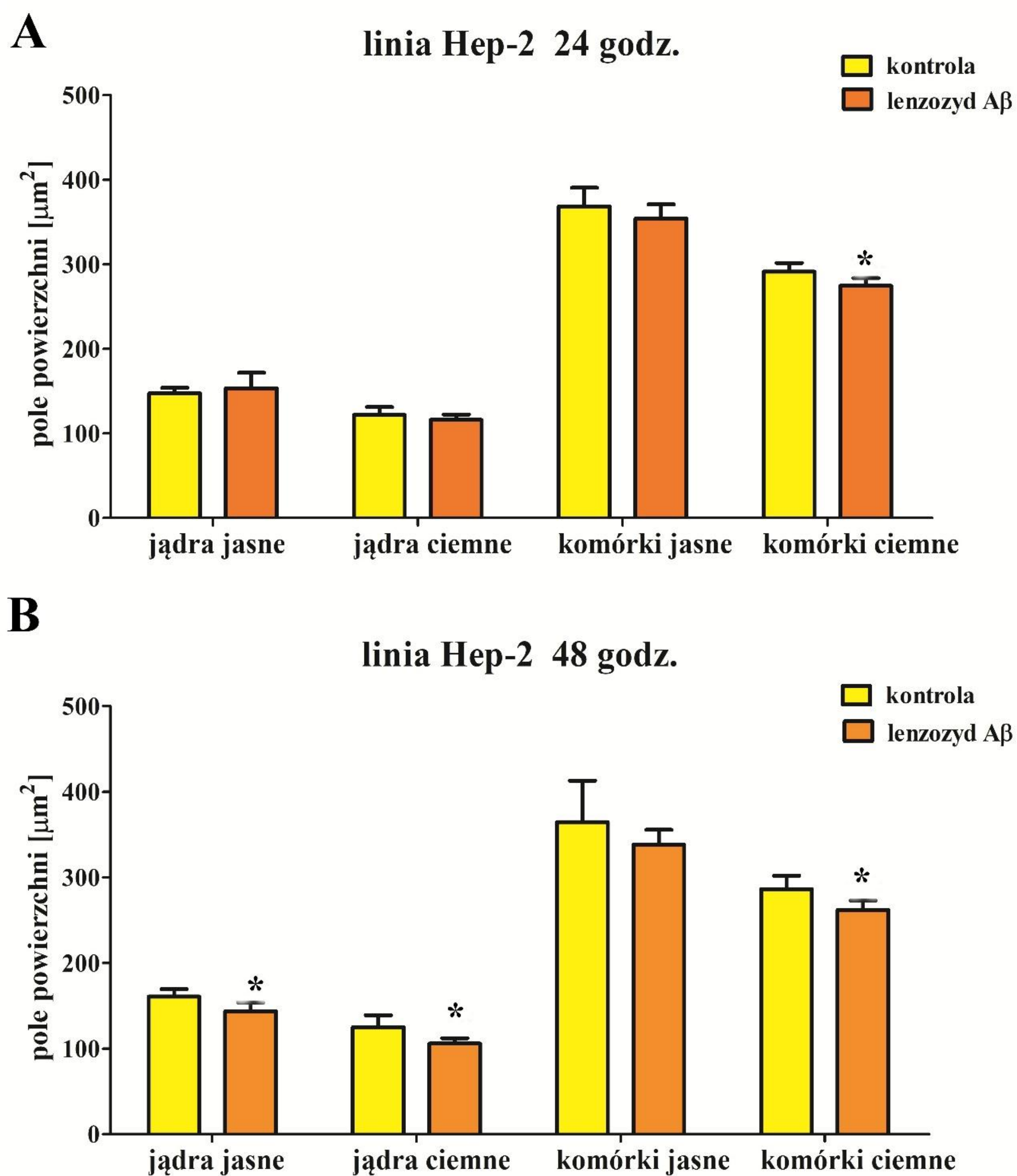
Po 24 godzinach inkubacji największe zmiany odnotowano w przypadku komórek ciemnych i jąder ciemnych, w których badany parametr uległ zmniejszeniu odpowiednio o 17,4% i 20,7% w stosunku do kontroli (Ryc. 60 A).

Po dłuższym czasie inkubacji w komórkach jasnych pole powierzchni zmniejszyło się o 43,5% w stosunku do komórek kontrolnych. Tymczasem, w komórkach ciemnych traktowanych flawonoidem średnie pole powierzchni wynosiło 57,1 μm^2, natomiast średnie pole powierzchni próby kontrolnej równało się 129,9 μm^2. Oznacza to, iż pole powierzchni komórek ciemnych pod wpływem badanego związku zmniejszyło się o 56,1%. Dodanie lenzozydu Aβ spowodowało również zmniejszenie pola powierzchni jąder jasnych i ciemnych. Pole powierzchni jąder jasnych zmniejszyło się o 33,9% w stosunku do kontroli. W przypadku jąder ciemnych z próby badanej pole powierzchni (24,8 μm^2) zmniejszyło się o 31,7% w stosunku do pola powierzchni jąder ciemnych komórek hodowli kontrolnej (36,3 μm^2) (Ryc. 60 B).

W komórkach linii Hep-2 po 24 godzinnej inkubacji z lenzozydem Aβ nastąpiło niewielkie zmniejszenie tego parametru. Pole powierzchni komórek jasnych uległo zmniejszeniu o 3,9%. W komórkach ciemnych traktowanych badanym związkiem, średnie pole powierzchni wynosiło 274,6 μm^2 podczas gdy średnie pole powierzchni komórek kontrolnych wynosiło 291,4 μm^2. W przypadku jąder ciemnych pole powierzchni zmniejszyło się o 4,6% w stosunku do kontroli (Ryc. 61 B). Podobne wyniki odnotowano po 48 godzinnej inkubacji z badanym flawonoidem. Parametr ten uległ zmniejszeniu zarówno w przypadku komórek jak i jąder. W komórkach jasnych w próbie kontrolnej średnie pole powierzchni wynosiło 364,5 μm^2, natomiast w komórkach poddanych działaniu lenzozydu Aβ wynosiło 338,1 μm^2 czyli zmniejszyło się o 7,2%. Z kolei pole powierzchni komórek ciemnych zmniejszyło się o 8,5% w stosunku do kontroli. Podobną tendencję obserwowano w jądrach jasnych i ciemnych. Ich pole powierzchni po wpływem flawonoidu zmniejszyło się odpowiednio o 10,5% i 15,3% (Ryc. 61 B).



Ryc. 60. Porównanie zmian pola powierzchni jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych (kontrolnych i traktowanych lenzozydem Aβ) z hodowli HeLa. A – 24-godzinna inkubacja, B – 48-godzinna inkubacja. n=20; ** $p \leq 0{,}005$; *** $p \leq 0{,}0005$; test t-Studenta.



Ryc. 61. Porównanie zmian pola powierzchni jasnych i ciemnych komórek oraz jąder komórkowych (z próby kontrolnej i traktowanych lenzozydem Aβ) z hodowli Hep-2. A – 24-godzinna inkubacja, B – 48-godzinna inkubacja. n=20; * $p \leq 0,05$; test t-Studenta.

4.12. Zmiany w morfologii komórek z hodowli *in vitro* pod wpływem lenzozydu Aβ

Celem badania było określenie wpływu lenzozydu Aβ na morfologię komórek badanych linii HeLa, Hep-2 i HSF z hodowli *in vitro*. Analizę powierzchni oraz ocenę ich morfologii przeprowadzono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Kontrolne komórki HeLa i Hep-2 wykazywały cechy morfologiczne typowe dla komórek nowotworowych. Hodowle komórek kontrolnych raka szyjki macicy i raka krtani były gęste, a komórki miały wydłużony kształty, były spłaszczone i adherentne. Na swojej powierzchni posiadały liczne wypustki (mikrokosmki). Obserwowano obecność połączeń między komórkami (Ryc. 62 A-C, Ryc. 63 A-C, Ryc. 64 A-C, Ryc. 65 A-C).

Po 24 i 48 godzinach inkubacji z badanym flawonoidem zaobserwowano wyraźne zmiany w morfologii i ilości komórek. Komórki z linii HeLa i Hep-2 były wrażliwe na każde z zastosowanych stężeń związku. Pod wpływem działania lenzozydu Aβ zmniejszyła się ilość komórek oraz obserwowano redukcję połączeń pomiędzy komórkami. Niektóre komórki obkurczyły się i charakteryzowały się mniejszą ilością wypustek (mikrokosmków) lub całkowicie je utraciły. W niektórych komórkach pojawiły się także ciałka apoptotyczne (Ryc. 62 D-F, Ryc. 63 D-F, Ryc. 64 D-F, Ryc. 65 D-F)

Kontrolne komórki fibroblastów skóry człowieka (linia HSF) charakteryzowały się wydłużonym kształtem, były spłaszczone i ściśle przylegały do podłoża. Na ich powierzchni obserwowano liczne mikrokosmki (Ryc. 66 A-C, Ryc. 67 A-C). Zarówno 24 jak 48 godzinna inkubacja z badanym związkiem nie zmieniła ich morfologii. Obserwowane komórki były spłaszczone, miały wydłużony kształt i były adherentne (Ryc. 66 D-F, Ryc. 67 D-F).

Ryc. 62. Obrazowanie komórek raka szyjki macicy (HeLa) przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego. A-C – komórki kontrolne, D-F – komórki inkubowane z lenzozydem Aβ przez 24 godziny.

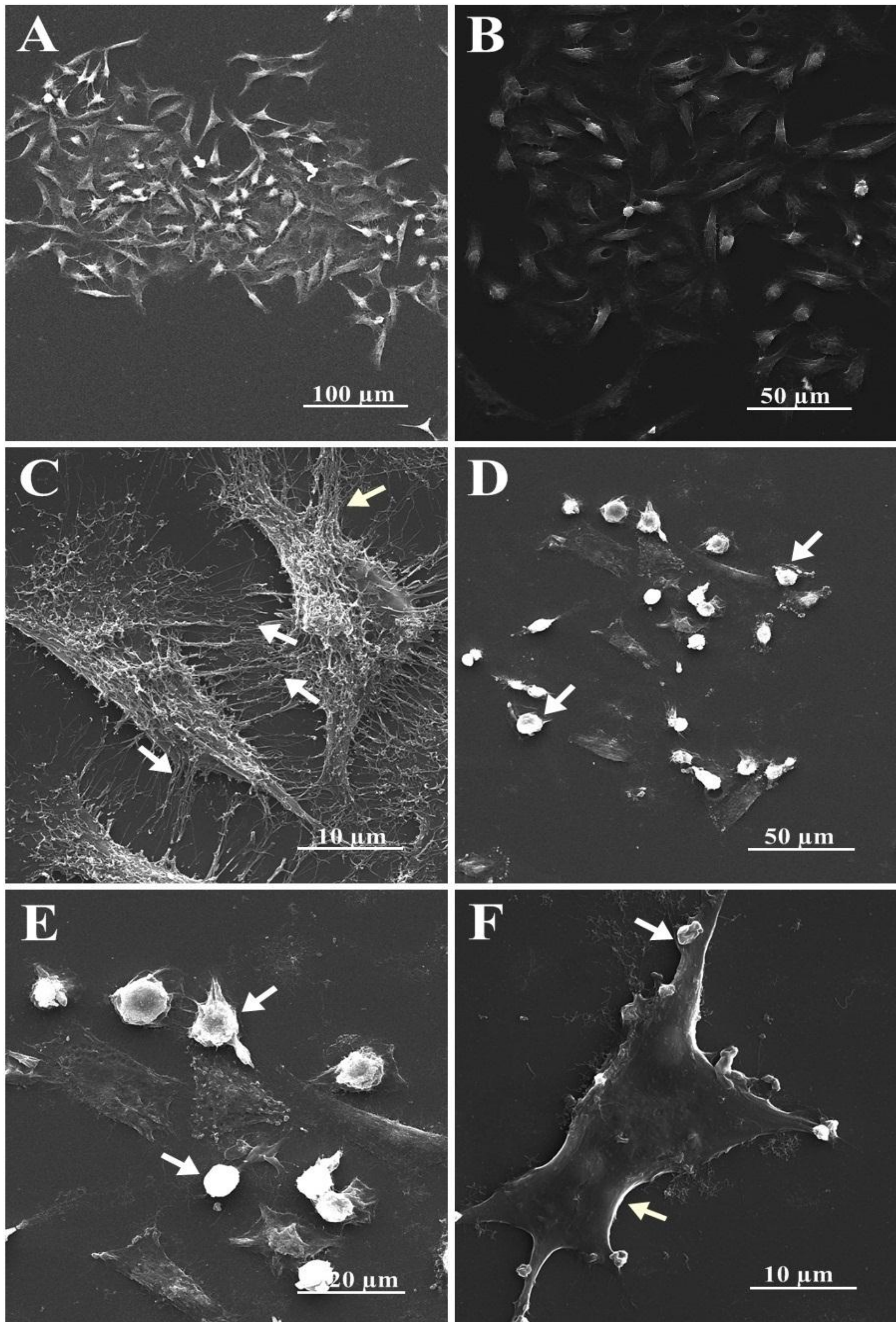
A – Komórki z hodowli kontrolnej – gęsta hodowla, adherentne, wydłużone i spłaszczone komórki.

B – Wydłużone i spłaszczone komórki, przylegające do podłoża, liczne połączenia między komórkami.

C – Widoczne połączenia między komórki, obecne liczne mikrokosmki (strzałki).

D-E – Komórki HeLa inkubowane z badanym flawonoidem w stężeniu 15 μg/ml. Komórki obkurczone, redukcja połączeń między komórki.

F – Komórki HeLa inkubowane z lenzozydem w dawce 50 μg/ml. Redukcja mikrokosmków (strzałka), obecne pęcherzyki błony.



Rycina 62

Ryc. 63. Morfologia komórek linii HeLa poddanych działaniu badanego flawonoidu. A-B – komórki z hodowli kontrolnej; C-F – komórki po 48 godzinnej inkubacji z lenzozydem Aβ.

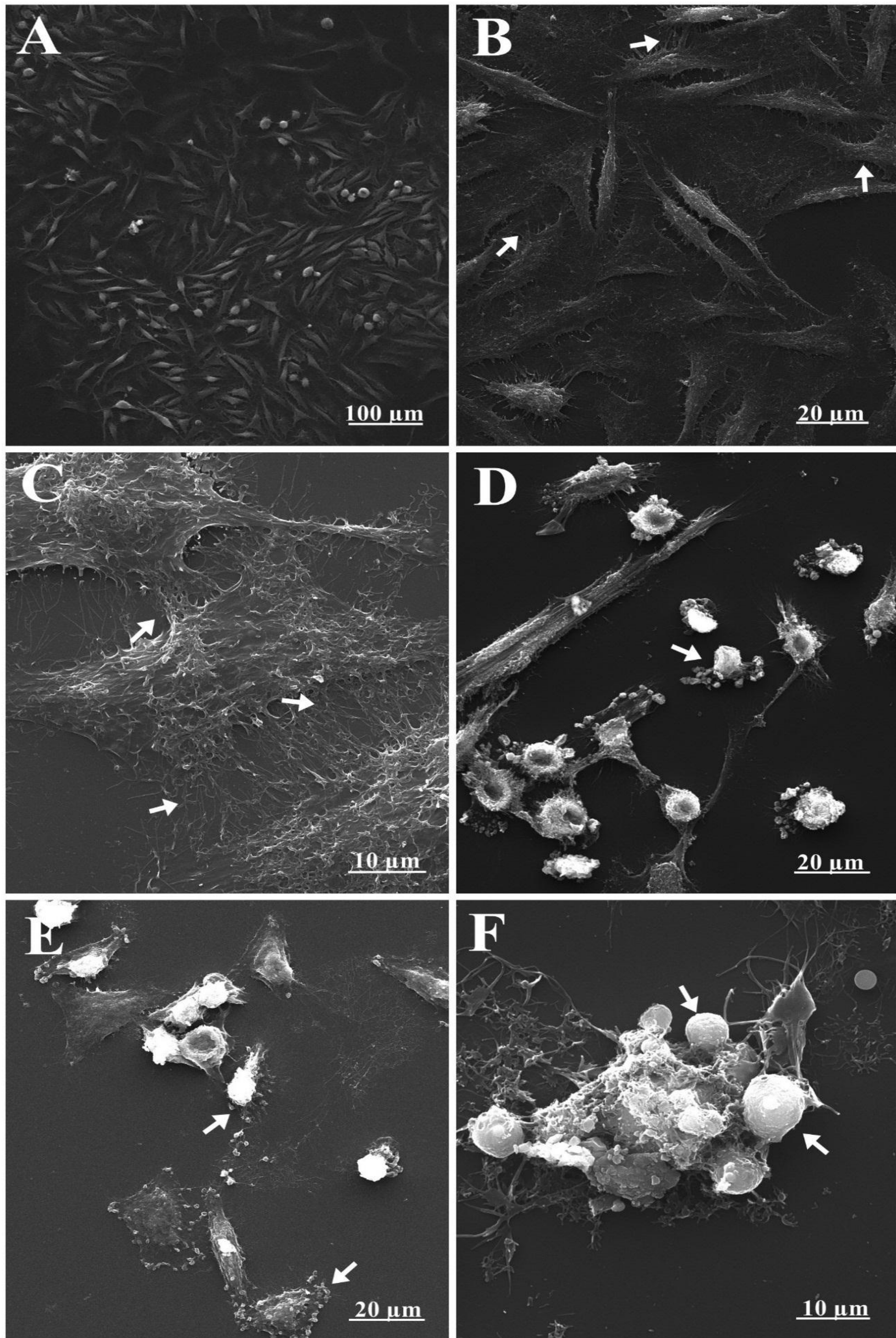
A – Gęsta hodowla, komórki ściśle przylegają do podłoża, są wydłużone i spłaszczone.

B – Widoczne połączenia między sąsiednimi komórkami (strzałki). Komórki mają wysłużony kształt i są spłaszczone.

C – Prawidłowa morfologia komórek linii HeLa. Obecne liczne mikrokosmki (strzałki).

D-E – Komórki HeLa inkubowane z badanym flawonoidem w stężeniu 25 μg/ml. Komórki obkurczone, nie przylegające ściśle do podłoża, redukcja połączeń między komórki oraz brak mikrokosmków. Obecne ciałka apoptotyczne (strzałki).

F – Komórki HeLa inkubowane z lenzozydem Aβ w dawce 50 μg/ml. Widoczne ciałka apoptotyczne (strzałki).



Rycina 63

Ryc. 64. Obrazowanie komórek przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. A-C – komórki kontrolne linii Hep-2, D-F – komórki traktowane lenzozydem Aβ przez 24 godziny.

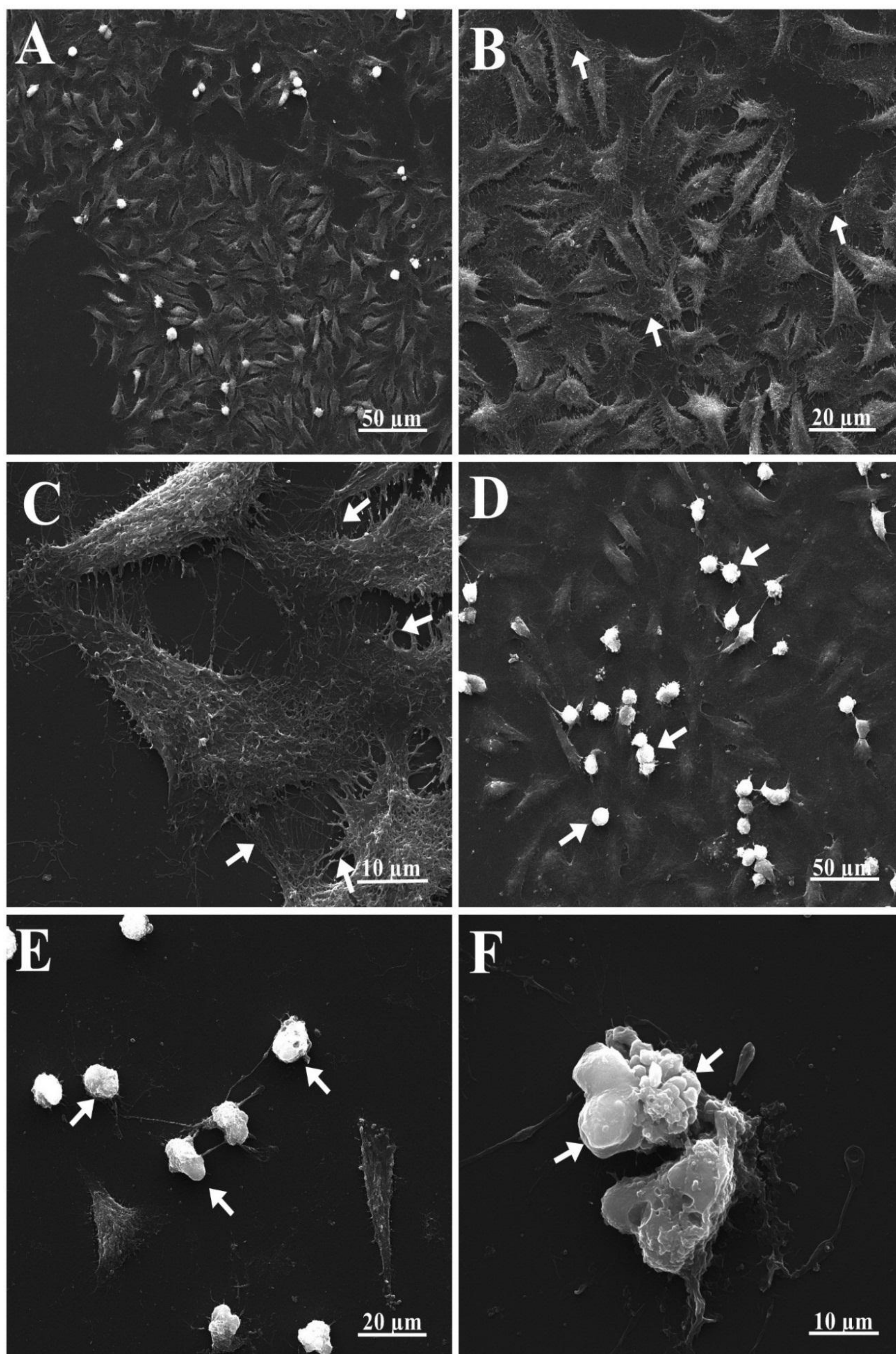
A-B – Hodowla kontrolna komórek raka krtani, komórki z hodowli kontrolnej. Liczne komórki o wydłużonym kształcie, ściśle przylegające do podłoża, obecne połączenia między komórkami.

C – Komórki kontrolne z widocznymi mikrokosmkami (strzałki).

D – Komórki Hep-2 inkubowane z badanym flawonoidem w stężeniu 15 μg/ml. Wzrost ilości komórek obkurczonych (strzałki), nie przylegających ściśle do podłoża, redukcja mikrokosmków.

E – Komórki Hep-2 inkubowane z badanym flawonoidem w stężeniu 25 μg/ml. Zmniejszenie ilości komórek. Obecne komórki obkurczone (strzałki), bez mikrokosmków, brak połączeń komórkowych.

F – Komórki Hep-2 inkubowane z lenzozydem w dawce 50 μg/ml. Widoczne ciałka apoptotyczne (strzałki).



Rycina 64

Ryc. 65. Obrazowanie morfologii komórek raka krtani (Hep-2) przy pomocy SEM. A-C – komórki z hodowli kontrolnej, D-F– komórki traktowane lenzozydem Aβ przez 48 godzin.

A – Gęsta hodowla komórek raka krtani. Komórki są adherentne i wydłużone. Na zdjęciach są widoczne liczne połączenia między komórkami.

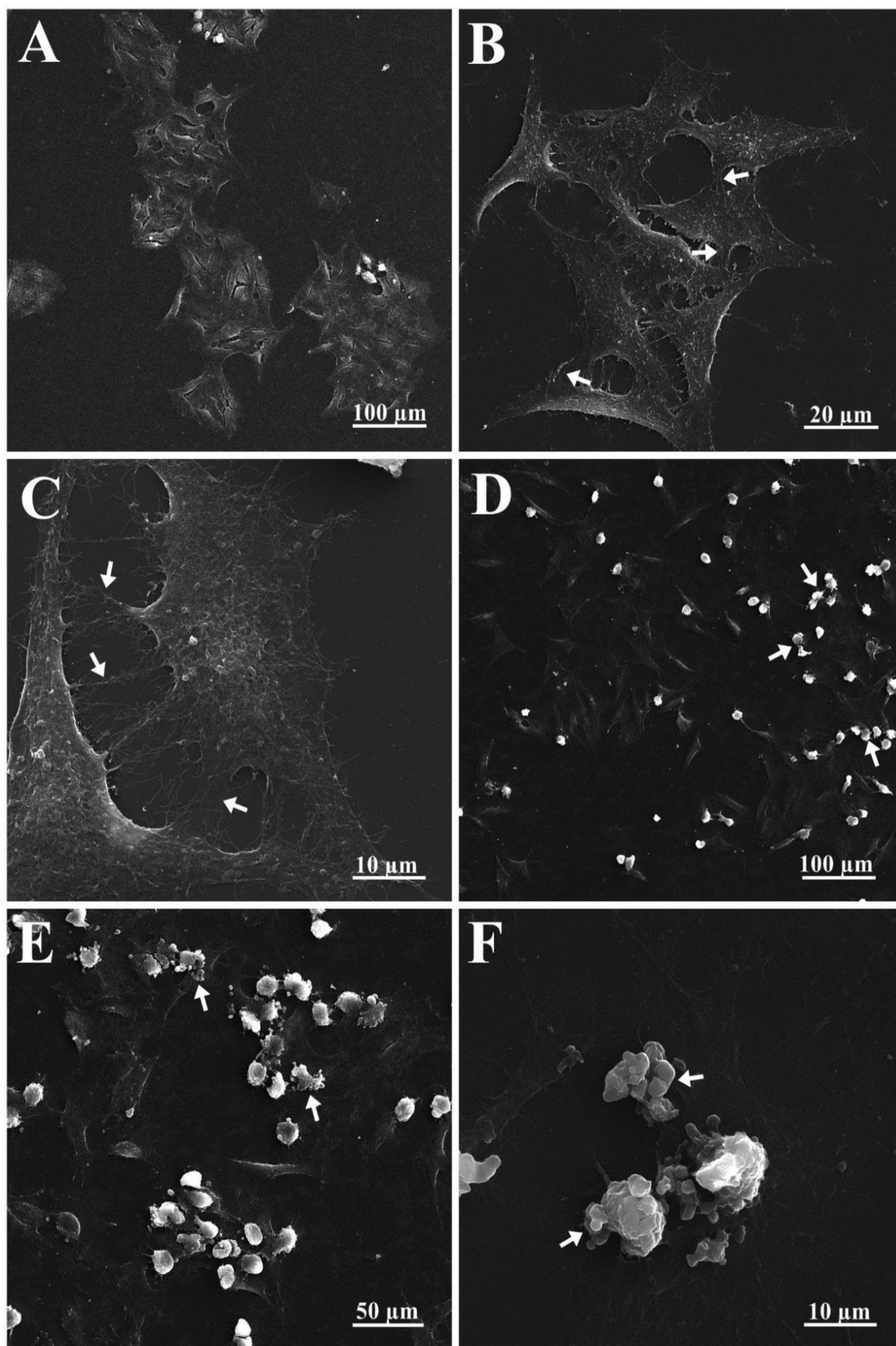
B – Obecne liczne połączenia między komórkami (strzałki). Komórki adherentne i spłaszczone.

C – Morfologia komórek z hodowli kontrolnej z widocznymi połączeniami między komórki i obecnymi mikrokosmki (strzałki).

D – Komórki Hep-2 poddane działaniu z badanego flawonoidu w stężeniu 15 µg/ml. Obecność komórek obkurczonych, nie przylegających ściśle do podłoża, o zredukowanej ilości mikrokosmków.

E – Komórki raka krtani po inkubacji z lenzozydem Aβ w dawce 25 µg/ml. Komórki są obkurczone i nie mają mikrokosmków. Widoczne ciałka apoptotyczne (strzałki).

F – Komórki Hep-2 traktowane badanym związkiem w dawce 50 µg/ml. Widoczne ciałka apoptotyczne (strzałki).

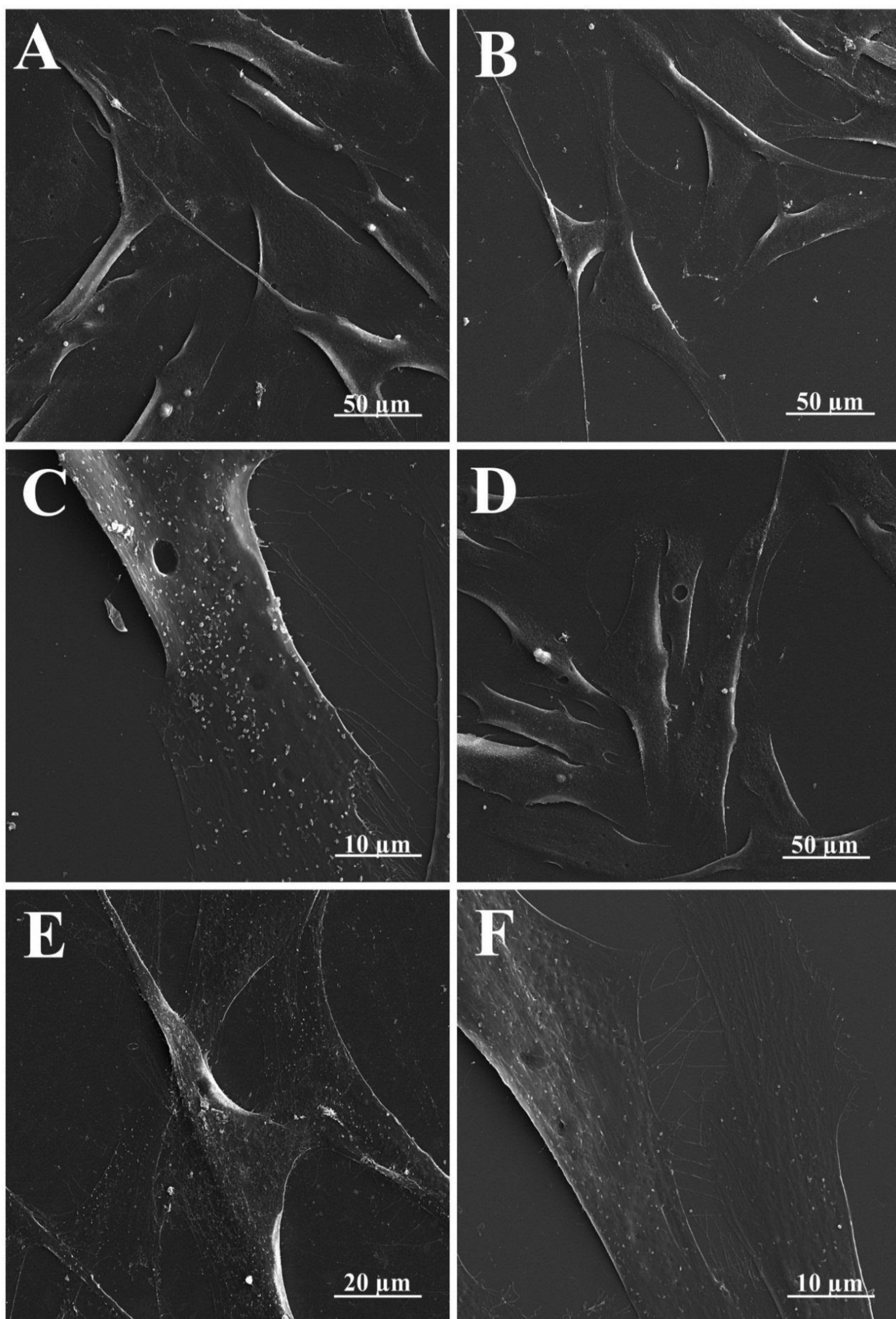


Rycina 65

Ryc. 66. Morfologia komórek fibroblastów skóry człowieka poddanych działaniu badanego flawonoidu. A-B – komórki z hodowli kontrolnej; C-F – komórki po 24 godzinnej inkubacji z lenzozydem Aβ.

A-C – Komórki kontrolne, adherentne i spłaszczone komórki o wydłużonym kształcie. Obecne połączenia między komórkami i wypustki komórkowe.

D-F – Komórki inkubowane z lenzozydem Aβ przez 24 godziny. Brak widocznych zmian w morfologii komórek. Komórki o wydłużonym kształcie, ściśle przylegające do podłoża. Obecne połączenia między komórkami i wypustki.

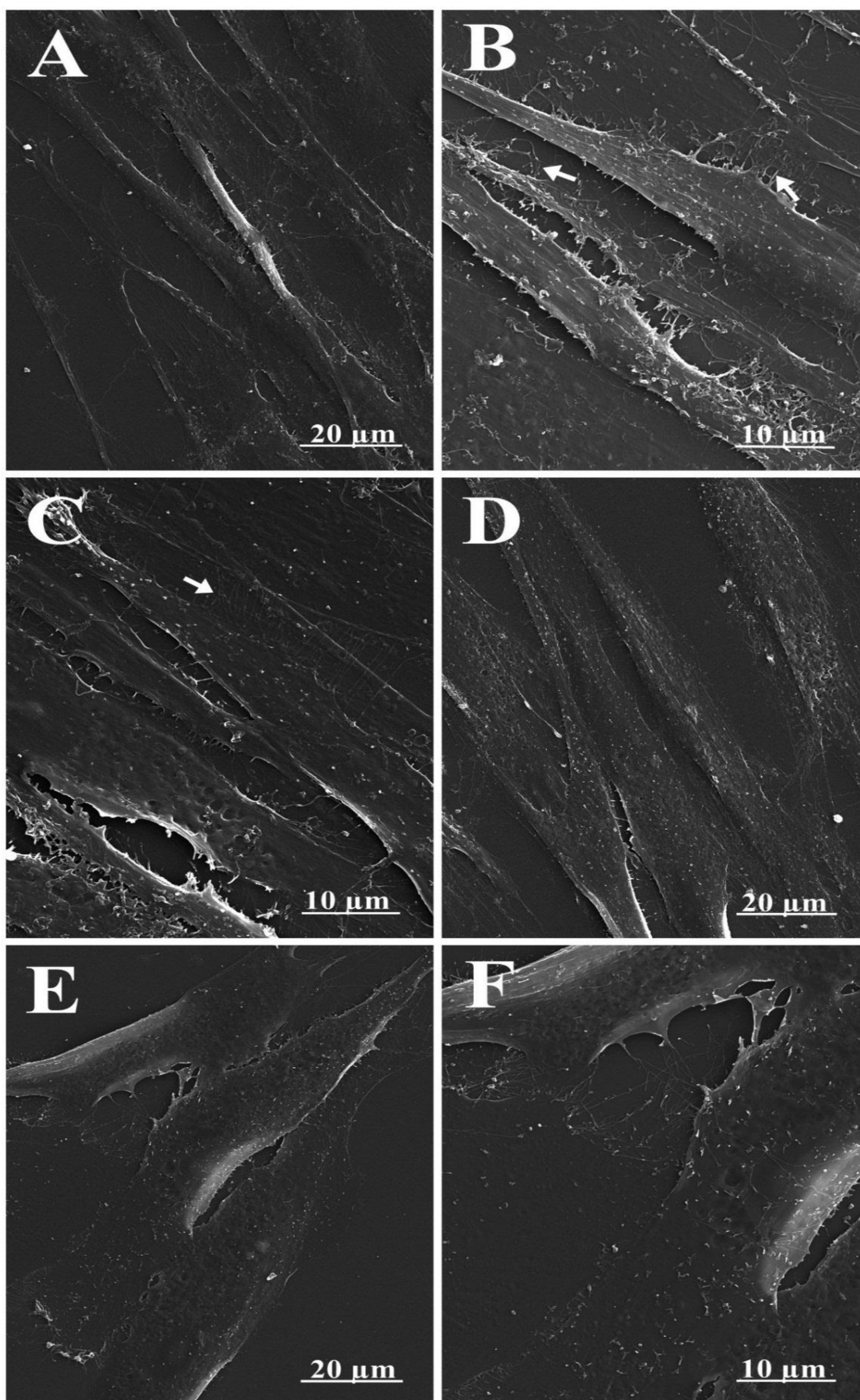


Rycina 66

Ryc. 67. Obrazowanie komórek przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. A-C – komórki kontrolne linii HSF, D-F – komórki traktowane lenzozydem Aβ przez 48 godzin.

A-C – Fibroblasty z hodowli kontrolnej. Widoczne spłaszczone komórki o wydłużonym kształcie, ściśle przylegające do podłoża. Obecne połączenia między komórkami i wypustki komórkowe.

D-F – Brak widocznym zmian w fibroblastach traktowanych lenzozydem Aβ przez 48 godzin. Komórki są wydłużone, adherentne z widocznymi połączenia między sąsiednimi komórkami.



Rycina 67

4.13. Zmiany w ultrastrukturze komórek z hodowli *in vitro* pod wpływem lenzozydu Aβ

Zmiany w ultrastrukturze komórek wywołane działaniem badanego flawonoidu oceniono przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Komórki linii HeLa, Hep-2 i HSF inkubowano z flawonoidem w stężeniu 15 µg/ml przez 24 godziny.

Komórki z hodowli kontrolnej HeLa charakteryzowały się dużym, centralnie położonym jądrem z widocznym jąderkiem. W obrębie cytoplazmy znajdowały się prawidłowo ukształtowane mitochondria, retikulum endoplazmatyczne oraz niewielkie wakuole. Obserwowano liczne mikrokosmki (Ryc.68 A-B).

Pod wpływem lenzozydu Aβ w ultrastrukturze komórek raka szyjki macicy zaszły wyraźne zmiany. Jądra komórkowe były obkurczone, bez widocznego jąderka i miały nieregularny kształt. W cytoplazmie pojawiły się liczne skondensowane mitochondria, autofagosomy i autolizosomy. Komórki charakteryzowały się dużą wakuolizacją i uwpukleniami błony. Obserwowano redukcję mikrokosmków (Ryc. 68 C-F).

Komórki kontrolne linii Hep-2 posiadały duże centralnie położone jądra komórkowe o regularnym kształcie z wyraźnie zaznaczonym jąderkiem i równomiernie rozproszoną chromatyną, otoczone otoczką jądrową i zajmujące większą część komórki. Cytoplazma była prawidłowo ukształtowana a na jej obszarze znajdowały się liczne mitochondria, pojedyncze wakuole oraz siateczka śródplazmatyczna. Dobrze widoczne były mikrokosmki błony komórkowej oraz połączenia między komórkami (Ryc. 69 A-B).

Po 24 godzinach inkubacji z lenzozydem Aβ zaobserwowano wyraźne zmiany w ultrastrukturze komórek raka krtani. Komórki posiadały obkurczone w stosunku do cytoplazmy jądra o nieregularnym kształcie, bez widocznego jąderka, a na ich terenie pojawiła się pofragmentowana chromatyna (Ryc. 69 E). Na obszarze cytoplazmy obserwowano zwiększoną liczbę skondensowanych, nierównomiernie rozmieszczonych mitochondriów oraz liczne pęcherzyki, zlewające się ze sobą w duże wakuole (Ryc. 69 C-F).

Z kolei komórki kontrolne fibroblastów skóry człowieka charakteryzowały się wydłużonym kształtem. Miały duże, położone centralnie jądro z jąderkiem. W cytoplazmie

dobrze widoczna była siateczka śródplazmatyczna oraz pojedyncze mitochondria i wakuole (Ryc. 70 A-B).

Badany flawonoid nie powodował wyraźnych zmian w komórkach HSF. Podobnie jak w komórkach kontrolnych, komórki były wydłużone. Obserwowano duże jądra z widocznymi jąderkami, otoczone otoczką jądrową. Cytoplazma była prawidłowo ukształtowana a na jej obszarze znajdowały się pojedyncze wakuole oraz siateczka śródplazmatyczna. Odnotowano obecność mitochondriów o wydłużonym kształcie (Ryc. 70 C-F).

Ryc. 68. Ultrastruktura komórek linii HeLa w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. A-B – komórki kontrolne linii HeLa, C-F – komórki inkubowane z lenzozydem Aβ przez 24 godziny

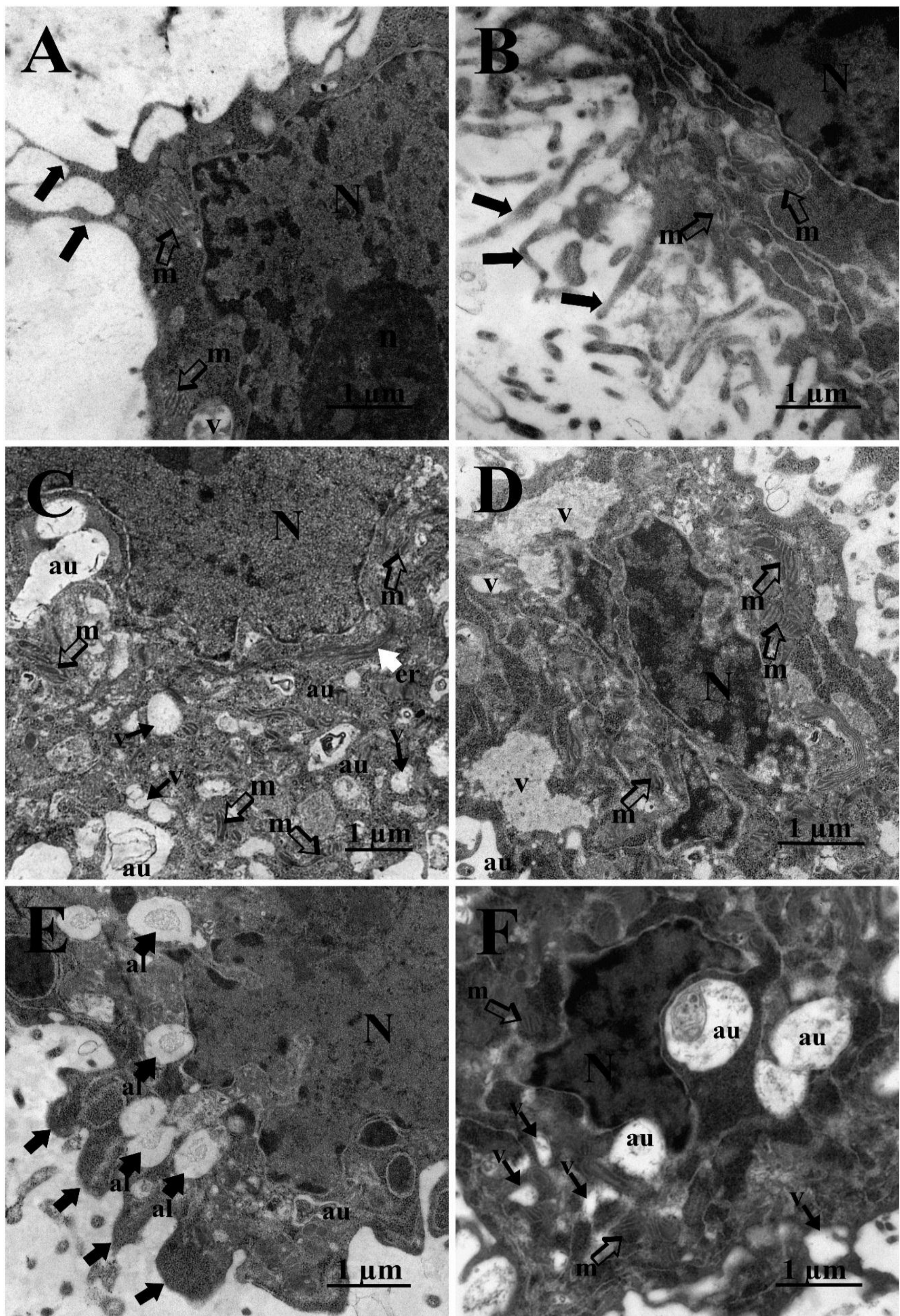
A-B – Komórki z dużym centralnie położonym jądrem komórkowym (N), prawidłowo ukształtowana cytoplazma z widocznymi mitochondriami (m), czarne strzałki wskazują liczne mikrokosmki.

C – Fragment komórki z widocznym jądrem komórkowym (N) o nieregularnym kształcie, silna wakuolizacja (v), obecne liczne mitochondria (m) w postaci skondensowanej oraz autofagosomy (au).

D – Fragment komórki o nieregularnym kształcie z obkurczonym i pofragmentowanym jadrem (N) i skondensowaną chromatyną.

E – Komórka HeLa poddana działaniu badanego flawonoidu. Widoczna silna wakuolizacja. Obecność licznych oraz obecne autolizosomy oraz uwpuklenia błony (czarne krótkie strzałki), brak widocznych mikrokosmków.

F – Widoczne silnie obkurczone jądro (N), liczne autofagosomy (au).


A
N
m
m
n
v
1 µm
B
N
m
m
1 µm
C
N
au
m
m
er
au
v
v
v
au
m
m
au
1 µm
D
v
v
m
m
N
v
m
au
1 µm
E
al
al
N
al
al
au
1 µm
F
m
N
au
au
au
v
v
v
v
m
1 µm

Rycina 68

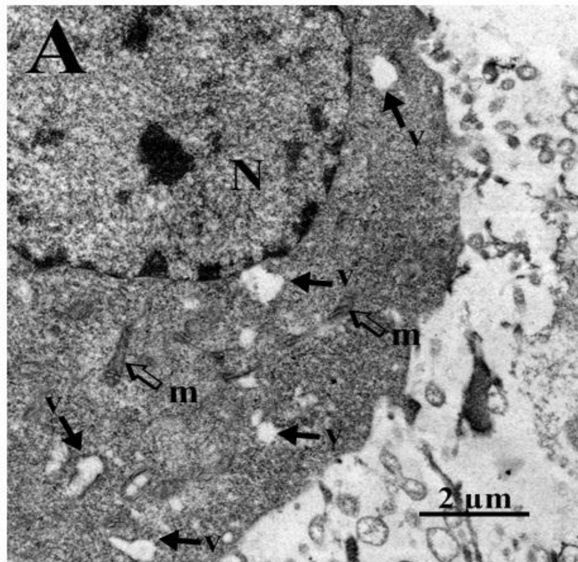
Ryc. 69. Wpływ lenzozydu Aβ na ultrastrukturę komórek linii Hep-2. A -B – kontrola; C-F - komórki traktowane lenzozydem Aβ przez 24 godziny.

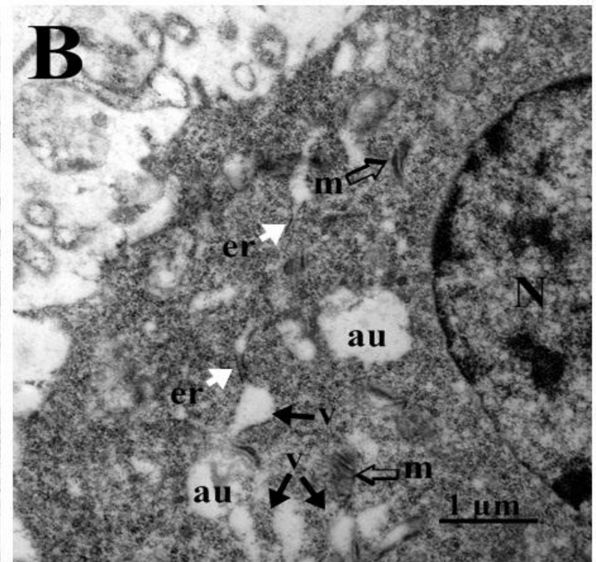
A-B – Komórki kontrolne z centralnie położonym jądrem komórkowym (N) o regularnym kształcie, w cytoplazmie widoczne mitochondria (m), siateczka śródplazmatyczne (er), małe wakuole (v).

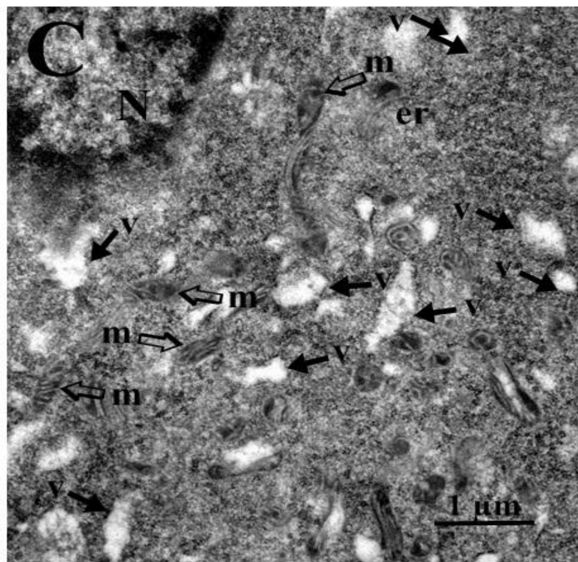
C-D – Komórka raka krtani z obkurczonym jądrem (N), w cytoplazmie obecne liczne wakuole (v), autofagosomy (au) i skondensowane mitochondria (m)

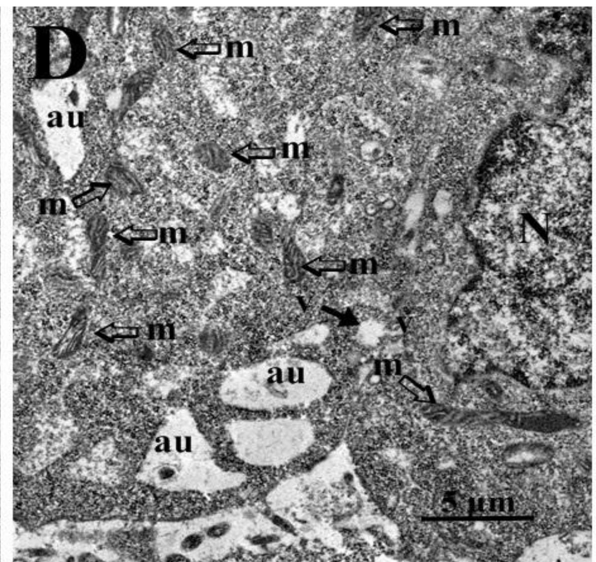
E – Brak widocznych mikrokosmków, silna wakuolizacja (v), obecne liczne autofagosomy. Zmniejszone jądro o nieregularnym kształcie (N).

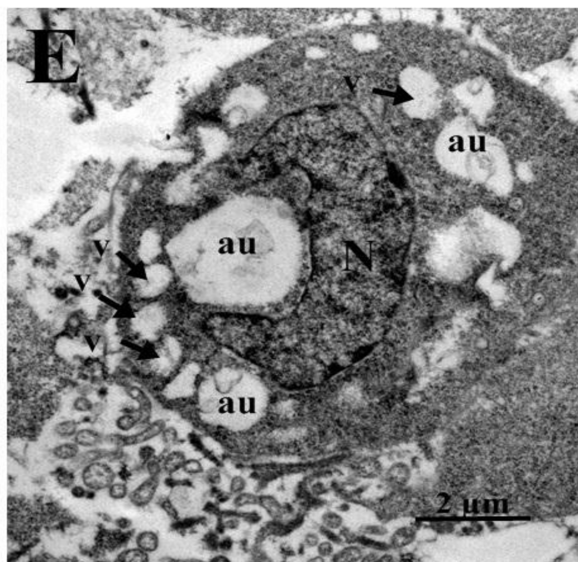
F – Komórka poddana działaniu lenzozydu Aβ z pofragmentowaną chromatyną, silnie skondensowaną cytoplazmą. Widoczne pojedyncze mitochondria (m) i małe pęcherzyki (v).

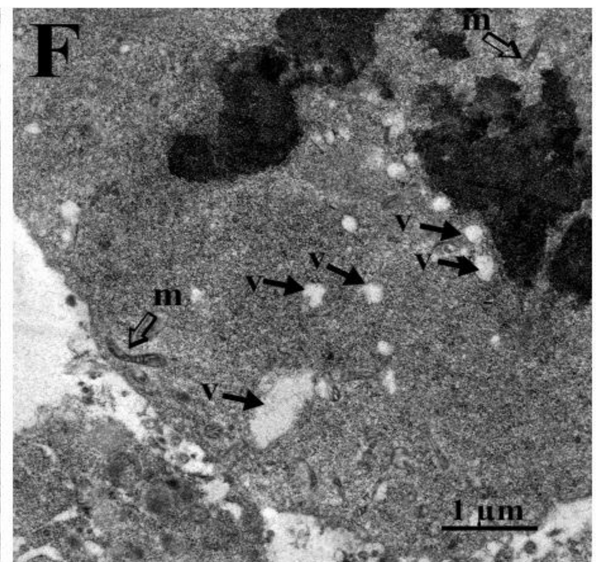

A
N
v
v
m
m
v
v
v
2 µm


B
m
er
au
N
er
v
v
m
au
1 µm


C
v
m
N
er
v
v
v
m
v
v
m
v
m
v
1 µm


D
m
m
au
m
m
m
N
m
v
v
m
au
m
au
5 µm


E
v
au
v
au
N
v
v
au
2 µm


F
m
v
v
v
v
m
v
v
1 µm

Rycina 69

Ryc. 70. Ultrastruktura komórek linii HSF. A-B – komórki kontrolne , C-F- fibroblasty poddane 24-godzinnej inkubacji z lenzozydem Aβ.

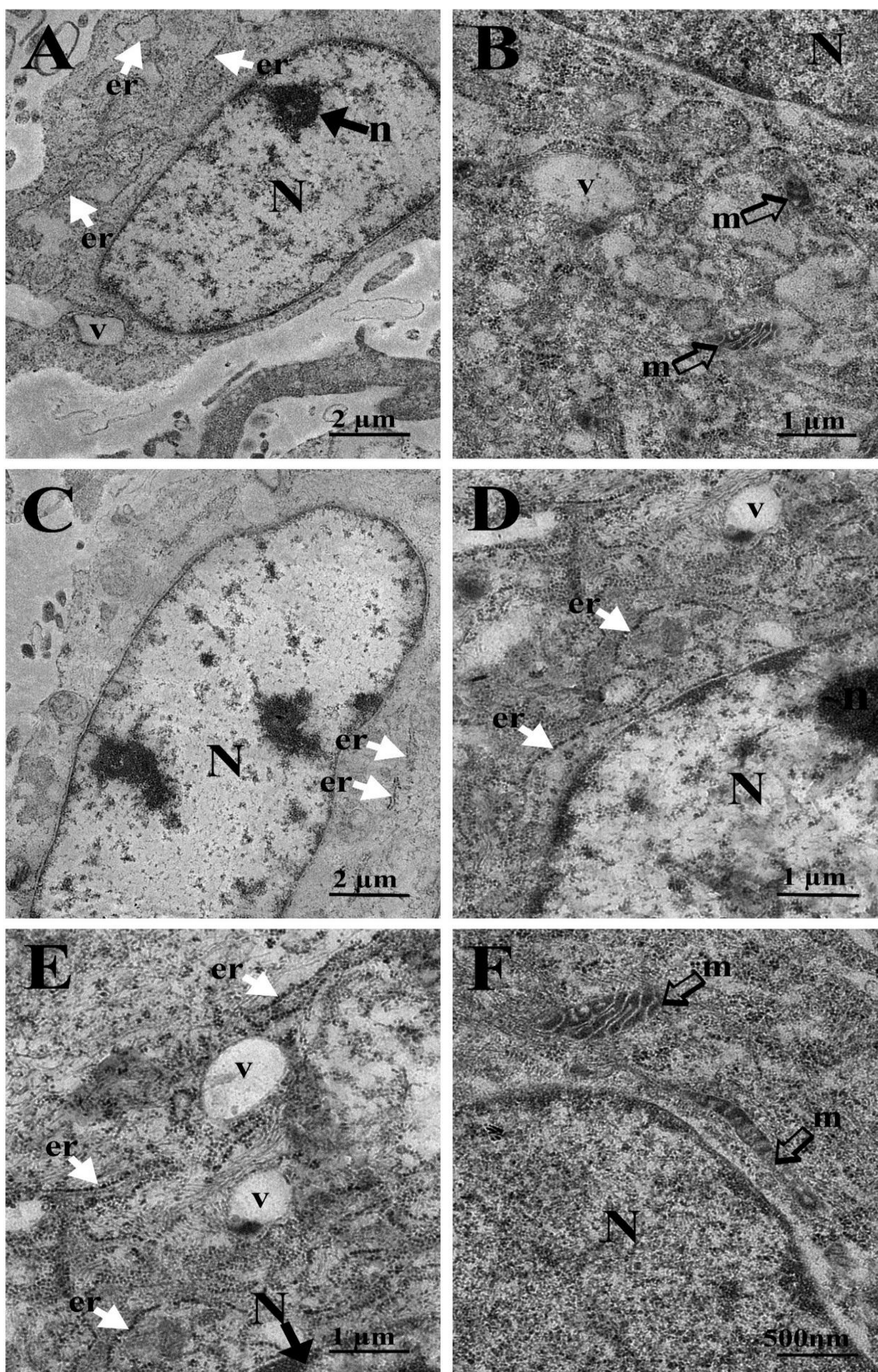
A – Komórka kontrolna z dużym rozmieszczonym na środku jądrem (N), widoczne jąderko (n). W cytoplazmie prawidłowo ukształtowana siateczka śródplazmatyczna (er).

B – Fragment cytoplazmy komórki z obecnymi mitochondriami (m) i wakuolami (v).

C – Fibroblast skóry człowieka poddany działaniu lenzozydu Aβ. W centrum duże jądro otoczone otoczką jądrową. Prawidłowa cytoplazma z obecną siateczką śródplazmatyczną (er).

D-E – Brak widocznych zmian w komórkach traktowanych badanym związkiem. Widoczne jądro z wyraźnie zarysowanym jąderkiem. W cytoplazmie obecna siateczka śródplazmatyczna (er) i wakuole (v).

F – Wydłużone mitochondria w fibroblastach inkubowanych przez 24 godziny z lenzozydem Aβ.

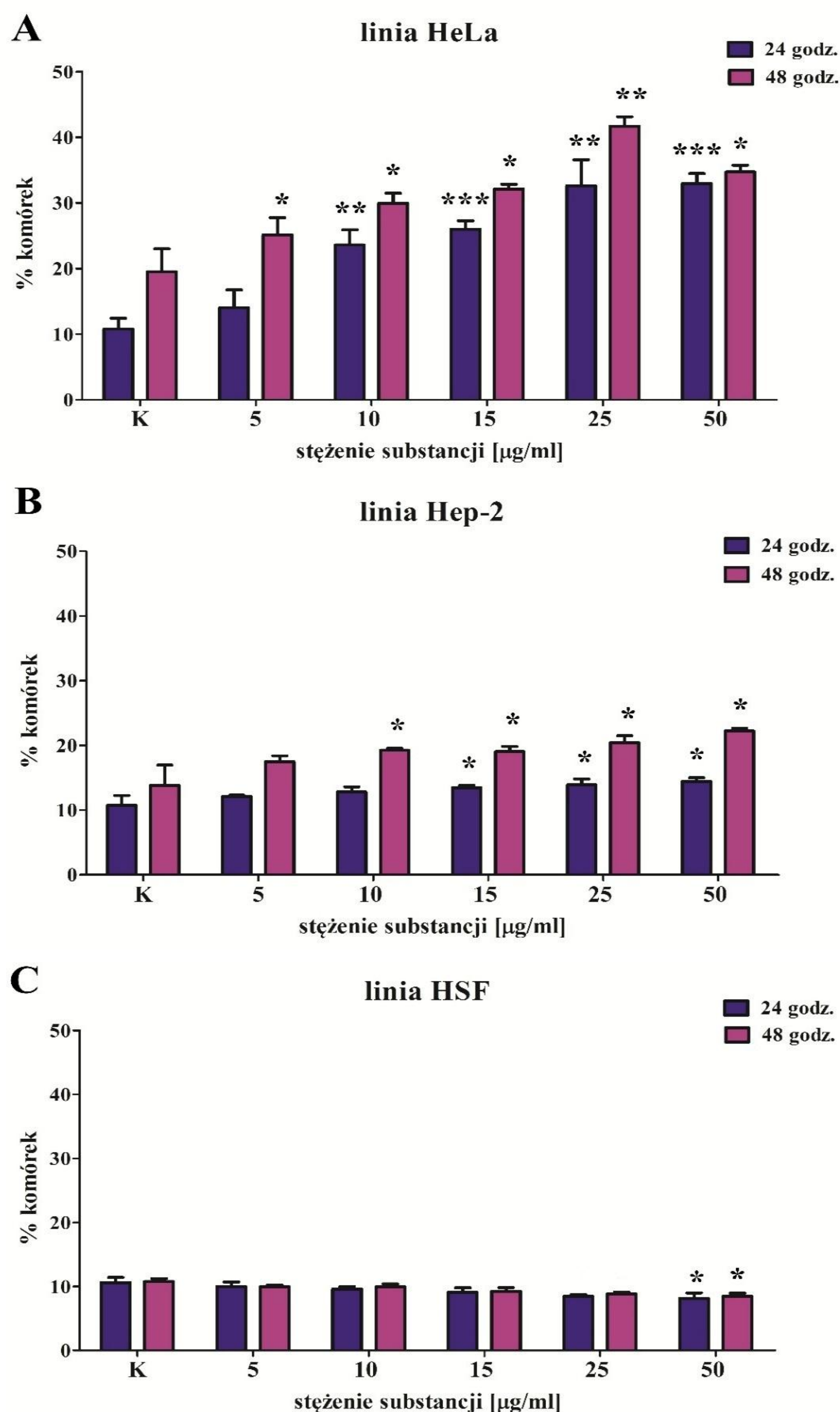

A
er
er
n
N
er
v
2 µm
B
N
v
m
m
1 µm
C
N
er
er
2 µm
D
v
er
er
n
N
1 µm
E
er
v
er
v
er
N
1 µm
F
m
m
N
500nm

Rycina 70

4.14. Wpływ lenzozydu Aβ na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach z hodowli *in vitro*

Badanie miało na celu określenie wpływu badanego związku na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach z hodowli *in vitro*. W przypadku komórek charakteryzujących się wysokim poziomem rekatywnych form tlenu (ROS) obserwowano intensywną zieloną fluorescencję mitochondriów. Wyniki przedstawiono w postaci procentowego udziału komórek wykazujących podwyższony poziom wolnych rodników w całej populacji badanych komórek.

W komórkach linii HeLa, zarówno po 24 jak i 48- godzinnej inkubacji, lenzozyd Aβ powodował indukcję stresu oksydacyjnego. Po 48 godzinach obserwowano charakterystyczną zieloną florescencję mitochondriów u 40 % komórek (stężenie 25 μg/ml) (Ryc. 71 A). Niewielką indukcję stresu oksydacyjnego obserwowano również w komórkach raka krtani (Hep-2). Wydłużenie czasu inkubacji spowodowało zwiększenie ilości komórek o wysokim poziomie ROS, do 22,2% w dawce 50 μg/ml) (Ryc. 71 B). Z kolei w komórkach fibroblastów skóry człowieka (HSF) poddanych działaniu lenzozydu Aβ odnotowano odwrotne działanie. Badany związek po 48 godzinach inkubacji w najwyższym stężeniu zmniejszał ilość komórek wykazujących intensywną zieloną fluorescencję (Ryc. 71 C).



Ryc.71. Procent komórek wykazujących podwyższony poziom reaktywnych form tlenu po 24 i 48 godzinach działania lenzozydu Aβ. A - komórki linii HeLa, B - komórki linii Hep-2, C - komórki linii HSF. Wyniki przestawiono jako średnie ± SD. n=3, * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,005; *** p ≤ 0,0005; test t-Studenta.

V. Dyskusja

Flawonoidy są metabolitami wtórnymi powszechnie występującymi w roślinach. Ich głównym źródłem w diecie są przede wszystkim owoce i warzywa oraz produkty roślinne takie jak soki, zielona herbata czy czerwone wino. Związki te charakteryzują się szerokim spektrum aktywności biologicznych takich jak działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne czy przeciwbakteryjne. Pozytywnie wpływają na organizm człowieka i są wykorzystywane w profilaktyce i leczeniu chorób układu sercowo-naczyniowego, neurodegeneracyjnych oraz cukrzycy. Duże zainteresowanie wzbudza ich działanie przeciwnowotworowe. Hamują rozrost powstałych guzów i ich przerzuty. Jednym z miejsc ich oddziaływania jest błona komórkowa. Flawonoidy dzięki zdolności do interakcji z lipidowymi i białkowymi składnikami membran, mogą wpływać na płynność, przepuszczalność i integralność dwuwarstwy lipidowej jak również na aktywność białek integralnych i transport błonowy. Jak wynika z przeanalizowanej literatury ma to istotny wpływ na mechanizm ich działania. Jednocześnie liczne dane literaturowe wskazują na różny sposób oddziaływania tych związków na membrany. Może być to związane z różnicami w liczbie i rozmieszczeniu grup hydroksylowych, stopniem polaryzacji jak również z obecnością dodatkowych ugrupowań w pierścieniu C.

Obiektem zainteresowania badawczego w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej jest lenzozyd Aβ (kwercetyna-3-O-[6-O-E-kofeilo)-β-D-glukopiranozylo(1→2)]-β-D-galaktopiranozylo-7-O-β-D-glukuropiranozyd) należący do flawonoidów. Związek ten został wyizolowany z nadziemnych części soczewicy jadalnej (*Lens culinaris*) odmiany Tina. Jest to pochodna dobrze poznanego flawonoidu – kwercetyny, która oprócz charakterystycznego układu pierścieni aromatycznych w swojej strukturze posiada podstawniki w postaci trzech reszt cukrowych oraz kwasu kawowego. Tak rozbudowana struktura i amifpatyczny charakter związku może wpływać na sposób jego odziaływania na błonę komórkową. Dlatego głównym celem pracy było zbadanie zdolności lenzozydu Aβ do wchodzenia w interakcje z modelowymi błonami uformowanymi z dipalmitylofosfatydylocholiny (DPPC) oraz ocena jego wpływu na strukturalne i dynamiczne właściwości dwuwartswy lipidowej. Kolejnym celem było określnie lokalizacji i orientacji związku w błonie i sprawdzenie jego wpływu na lipidy i białka komórek nowotworowych i prawidłowych. Do oceny skutków wbudowania się lenzozydu Aβ do błon

wyznaczono cele cząstkowe, które obejmowały określenie cytotoksycznych właściwości związku w stosunku do badanych komórek, zbadanie jego zdolności do indukcji śmierci komórkowej, analizę morfologii, ultrastruktury oraz parametrów morfometrycznych komórek oraz zbadanie jego wpływu na białka transportowe błon.

Pierwszym etapem badań było sprawdzenie oddziaływania badanego flawonoidu na błony sporządzone z (DPPC). Błony komórkowe odgrywają ważną rolę w transporcie, dystrybucji, działaniu oraz toksyczności różnych substancji [Petelska i in., 2001; Yang i in., 1999]. Z tego względu istotne jest poznanie molekularnego mechanizmu interakcji flawonoidów z modelowymi błonami, których skład można kontrolować [Hausen i in., 1992; Mastrobattista i in., 1999]. Idealnym i często wykorzystywanym modelem w badaniach nad oddziaływaniem związku z membraną są błony uformowany z DPPC, których temperatura głównego przejścia fazowego (T_m) wynosi 314 K [Frezard, 1999; Huang i Li, 1999]. W niniejszej pracy wykorzystano technikę absorpcyjnej spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), w celu analizy oddziaływań molekularnych między badanym związkiem i lipidami błonowymi. W widmach absorpcyjnych w podczerwieni widoczne są bowiem pasma odpowiadające różnym drganiom, co umożliwia badanie interakcji cząsteczek z lipidami w błonie w jej różnych rejonach.

Badania lenzozydu Aβ na modelowych błonach utworzonych z DPPC wykazały istotny wpływ flawonoidu na dwuwarstwę lipidową. W widmach liposomów DPPC z dodatkiem badanego związku wykazano obecność szerokiego pasma o dużej intensywności (3367 cm^{-1}) charakterystycznego dla drgań rozciągających O-H. Oznacza to, że LAβ zwiększa frakcję wodną ściśle związaną z membraną poprzez wiązania wodorowe. Podobne wyniki otrzymał zespół Pawlikowskiej-Pawlęgi w badaniach nad innymi flawonoidami takimi jak kwercetyna, genisteina i apigenina [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2012, 2013 i 2014]. Wiązania te mogą być tworzone przez grupy hydroksylowe przyłączone do pierścienia cząsteczki lub grupy hydroksylowe reszt cukrowych przyłączonych do pierścieni aromatycznych związku [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2012, Popova i Hincha, 2016]. Dodanie związku spowodowało również przesunięcie pasm odpowiadających drganiom rozciągającym symetrycznym i antysymetrycznym grup – CH_2 łańcuchów alkilowych w kierunku wyższych liczb falowych. Wskazuje to na niewielkie działanie upłynniające flawonoidu w stosunku do frakcji lipidowej. W widmie różnicowym obserwowano również niewielkie obniżenie intensywności pasma reprezentującego estrowe grupy karbonylowe lipidu. Jednocześnie obserwowano pojawienie się pasma przesuniętego w kierunku niższych

częstości (1655 cm^{-1}) z dodatkowym ramieniem przy 1686 cm^{-1} o zwiększonej sile oscylatora. Takie obserwacje można wytłumaczyć tworzeniem wiązań wodorowych przez LAβ lub tworzeniem wiązań wodorowych pomiędzy nim i cząsteczkami wody [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2012; Popova i Hincha, 2013]. Amififilowy charakter cząsteczki badanego flawonoidu, który składa się z hydrofobowej struktury pierścieniowej i hydrofilowej części cukrowej, umożliwia takie interakcje. Z tego względu grupy P=O i C=O w obrębie głów lipidowych mogą tworzyć, wspomniane wiązania wodorowe, zarówno z grupami hydroksylowymi pierścieni aromatycznych jak również z tymi samymi grupami reszt cukrowych [Popova i Hincha, 2016]. Analiza FTIR ujawniła największe zmiany w obszarze drgań symetrycznych rozciągających grup – PO_2^- (1090 cm^{-1}) oraz drgań rozciągających ugrupowania C-O-P-O-C (1068 cm^{-1}). Wskazuje to wyraźnie, że lenzozyd Aβ wbudowuje się do regionu głów polarnych lipidów tworząc wiązania wodorowe z ugrupowaniem C-O-P-O-C. Jednocześnie takie zmiany spektralne wynikają z większej ilości cząsteczek wody związanej z tym obszarem poprzez wiązania wodorowe. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami badań zespołu Pawlikowskiej-Pawlęgi, w których przedmiotem badań było oddziaływanie kwercetyny na modelowe błony DPPC. Kwercetyna, której pochodną jest lenzozyd Aβ, wiązała się z regionem głów polarnych fosfolipidów za pomocą wiązań wodorowych, które tworzyły się pomiędzy jej grupami hydroksylowymi a polarnymi grupami lipidowymi w obszarze spektralnym odpowiadającym ugrupowaniu C-O-P-O-C głów [Pawlikowska-Pawlega i in., 2014]. Podobnie, wielu innych autorów wskazywało na interakcje flawonoidów z regionem polarnym głów fosfolipidów. Oteiza i współautorzy stwierdzili, że zdolność flawonoidów do oddziaływania z błonami oraz ich ochronne działanie, w tym zabezpieczanie błon przed rodnikami tlenowymi, jest związane z powstawanie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi tych związków a głowami cholinowymi fosfolipidów [Oteiza i in., 2005]. Lokalizację flawonoidów w obszarze polarnych głów liposomów wykazali też Bărbînţă Pătraşcu i współpracownicy [Bărbînţă Pătraşcu i in. 2009].

W kolejnym etapie badań określono wpływ flawonoidu na dynamiczne i strukturalne właściwości dwuwarstwy lipidowej za pomocą techniki jądrowego rezonansu magnetycznego (^{1}H NMR). W analizowanych widmach ^{1}H-NMR widoczne są pasma rezonansowe pochodzące z fragmentów cząsteczek lipidów rozmieszczonych w różnych rejonach dwuwarstwy lipidowej błony co pozwala na dokładne określenie oddziaływania związku na błony. Jak wynika z danych literaturowych glikozylacja flawonów zwiększa ich

powinowactwo do błon liposomalnych [Tarahovsky i in., 2014]. Dlatego na tej podstawie, można było przewidzieć, że cząsteczka LAβ, w której obecne są reszty cukrowe może wchodzić w interakcje z błonami i lokalizować się na granicy regionu polarnego i niepolarnego. Taką lokalizację potwierdziły wyniki uzyskane techniką ^{1}H NMR. Po dodaniu flawonoidu nastąpił wzrost szerokości połówkowej maksimum w obrębie grup CH_2 łańcuchów alkilowych, co wskazuje na niewielkie usztywniające działanie związku w tym regionie. Odwrotny efekt w tym rejonie membrany, obserwowany w badaniach z wykorzystaniem techniki FTIR (lekkie upłynnienie), najprawdopodobniej wskazuje na to, że inna organizacja lipidów błonowych w przygotowanych próbkach (liposomy w NMR/zorientowane dwuwarstwy w technice FTIR) do badań za pomocą tych dwóch technik może zmieniać/modulować działanie związku w stosunku do fazy lipidowej. Wbudowanie LAβ do liposomów DPPC spowodowało również ograniczenie swobody ruchów w rejonie główek polarnych. Jednocześnie obserwowano nieznaczne zmniejszenie parametru rozszczepienia (δ) z 0,6 do 0,56 ppm jak również poszerzenie pasm reprezentujących wewnętrzne i zewnętrzne warstwy główek cholinowych. Takie zmiany mogą być zinterpretowane jako interakcje lenzozydu Aβ z regionem główek polarnych fosfolipidów. Badany związek zmienił również współczynnik I_{out}/I_{in} z 0,84 w czystych liposomach do 0,57 w liposomach z dodatkiem LAβ. Na tej podstawie można wywnioskować, że flawonol modyfikuje właściwości fizyczne dwuwarstwy lipidowej i powoduje powstawanie wielowarstwowych liposomów o większych rozmiarach. Podobne wyniki obserwowano w badaniach nad kwercetyną prowadzonych przez zespół Pawlikowskiej-Pawlęgi [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2007]. Analiza NMR wykazała, że podobnie jak LAβ, kwercetyna lokalizując się w strefie główek polarnych fosfolipidów DPPC powodowała powstawanie liposomów o większej ilości warstw oraz zwiększała wartość szerokości połówkowej maksimum z rejonu grup cholinowych z wewnętrznej warstwy liposomów. Jednocześnie obserwowano jej upłynniające działanie w rejonie hydrofobowym błony. Inne działanie lenzozydu Aβ na dynamiczne właściwości hydrofobowego rdzenia membrany może wynikać z różnicy w strukturze kwercetyny i jej pochodnej. Obecne w cząsteczce LAβ reszty cukrowe są najprawdopodobniej odpowiedzialne za lekkie usztywnienie w obrębie alkilowych łańcuchów lipidowych i równocześnie mogą powodować silniejsze działanie w rejonie polarnym błony. Podobne działanie, do badanego w niniejszej pracy związku, wykazała glikozydowa pochodna kwercetyny (Q-7-MeGlu), uzyskana w wyniku biotransformacji przez grzyba *Beauveria bassiana*. Doświadczenia prowadzone techniką

^1H NMR na liposomach sporządzonych z DPPC wykazały znaczny wzrost wartości (o 142%) szerokości połówkowej maksimum odpowiadającej strefie grup cholinowych zewnętrznej warstwy liposomów ($N\text{-}(CH_3)_3{}^{out}$). Tak więc, w większym stopniu, hydrofilowy charakter tej pochodnej miał związek z silniejszym, w porównaniu do samej kwercetyny, odziaływaniem na liposomy w strefie polarnej błon [Strugała i in., 2017]. Liczne dane literaturowe wykazują, że flawonoidy, w tym kwercetyna i jej pochodne, lokalizują się na granicy dwuwartswy lipidowej i fazy wodnej. Z jednej strony obecność dodatkowych grup niepolarnych zwiększa głębokość penetracji cząsteczek (np. pochodne metoksylowe), zaś z drugiej wprowadzenie grup polarnych zmniejsza głębokość wnikania cząsteczek do błony (pochodne siarczanowe, glukuronowe) [Gabrielska i in., 2006]. Dodanie Q-7-MeGlu do liposomów, spowodowało również zmniejszenie wartości parametru rozszczepienia (δ) w rejonie głów polarnych, podobnie jak w pracy własnej. Wbudowane cząsteczki tej pochodnej usztywniło błonę i zmieniło rozkład ładunków na jej powierzchni. W efekcie ograniczone zostało wnikanie jonów Pr^{3+} do membrany. Ponadto, obserwowano, nieznaczne poszerzenie pasma charakterystycznego dla grup CH_2 [Strugała i in., 2017].

W celu uzupełnienia otrzymanych wyników, w badaniach wykorzystano metodę różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), która jest czułą techniką badającą wpływ substancji na fizyczne właściwości błony [Sinha i in., 2012]. Jak wykazały badania własne, dodanie lenzozydu Aβ w stężeniu 0,5mol% do liposomów wielkich jednowarstwowych liposomów (GUV) zmieniło parametry fizyczne dwuwartswy lipidowej. Flawonoid w niewielkim stopniu przesunął temperaturę głównego przejścia fazowego (T_m) w stronę niższych temperatur i jednocześnie spowodował zanik przedprzejścia fazowego. Ponadto, lenzozyd Aβ obniżył entalpię kalorymetryczną określaną jako całkowitą ilość energii niezbędną do zajścia przemiany termicznej. Można ją obliczyć jako pole powierzchni pod krzywą DSC. Badany związek obniżył również kooperatywność przejścia fazowego, która jest monitorowana jako szerokość połówkowa profilu temperaturowego ($T_{1/2}$) i oznacza liczbę cząsteczek lipidowych przechodzących przemianę fazową w tym samym czasie. Im wartość ($T_{1/2}$) jest wyższa, tym mniejsza jest kooperatywność przejścia fazowego [Bryszewska i Pałecz, 1994].

Obniżenie temperatury przejścia fazowego lipidów oraz kooperatywności jest związane z wbudowywaniem się związku do dwuwarstwy lipidowej. Po inkorporacji do błony zmienia on ułożenie fosfolipidów, zaburzając tym samym ich uporządkowaną strukturę, co w efekcie obniża T_m [Jain, 1988]. Taki sam efekt wykazali Sinha i

współpracownicy badając oddziaływanie kwercetyny oraz jej syntetycznych pochodnych na wielowarstwowe liposomy uformowane z DPPC. W swoich badaniach, obserwowali obniżenie temperatury głównego przejścia fazowego. Z kolei dodatek pochodnych flawonolu, w których usunięto trzy grupy hydroksylowe a czwartą podstawiono $-Cl_2$ (Q1) lub grupą $-OCH_3$ (Q2) w mniejszym stopniu obniżał T_m. Podobnie jak w pracy własnej, zarówno w przypadku kwercetyny jak i jej pochodnych autorzy ci odnotowali zanik przedprzejścia fazowego [Sinha i in., 2012]. Zespół Wesołowskiej i współautorów, którzy w swoich doświadczeniach z zastosowaniem różnicowej kalorymetrii skaningowej sprawdzali wpływ apigeniny, moryny i mirycetyny na termotropowe właściwości modelowych błon sporządzonych z DMPC i DPPC, uzyskał podobne wyniki. Wszystkie badane flawonoidy znosiły przedprzejście fazowe, powodowały obniżenie temperatury głównego przejścia fazowego oraz entalpi. Dodatkowo, moryna obniżała kooperatywność przejścia fazowego DMPC. Jednocześnie zmiany w parametrach przejścia były znacznie bardziej wyraźne w liposomach sporządzonych z DMPC niż DPPC, co jak tłumaczyli autorzy, było spowodowane słabszymi interakcjami między łańcuchami acylowymi DMPC, które są krótsze niż w DPPC [Wesołowska i in., 2009]. Według Jain i Wu obniżenie temperatury głównego przejścia fazowego, entalpii kalorymetrycznej oraz kooperatywności przejścia jest charakterystyczne dla związków, które lokalizują się na granicy fazy polarnej i niepolarnej błony. Takie umiejscowienie flawonoidów w błonie wynika z ich struktury chemicznej: hydrofobowy układ pierścieni odpowiada za interakcję z łańcuchami acylowymi lipidów, natomiast grupy hydroksylowe za oddziaływanie z regionem polarnym głów lipidowych [Jain i Wu, 1977].

Istotnym aspektem mającym wpływ na sposób oddziaływania związku z błoną jest jego lokalizacja i orientacja w dwuwarstwie lipidowej. Rozmieszczenie flawonoidów w membranach wpływa zarówno na ich strukturę, właściwości i funkcje w tym na płynność i transport jonowy [Tsuchiya, 2001; Arora i in., 2000, Wójtowicz i in., 1996]. Dlatego w kolejnym etapie pracy określono lokalizację i orientację lenzozydu Aβ z wykorzystaniem techniki mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM). Ilościowa analiza rozkładu intensywności fluorescencji na obrazach mikroskopowych reprezentujących przekroje poprzeczne wielkich jednowarstwowych liposomów z płaszczyzny ogniskowej umożliwia precyzyjne określenie orientacji przejścia dipolowego cząsteczek fluorescencyjnych względem osi normalnej do płaszczyzny błony. Ze względu na zasadę fotoselekcji, cząsteczki zorientowane równolegle do płaszczyzny błony (orientacja

pozioma) dają sygnały fluorescencji w górnej i dolnej części liposomu, podczas gdy cząsteczki rozmieszczone prostopadle w stosunku do płaszczyzny błony (orientacja pionowa) spowodują wzrost intensywności fluorescencji w prawym i lewym regionie pęcherzyka [Grudziński i in., 2016]. Na zeskanowanych obrazach przekrojów liposomów obserwowano znacznie wyższą intensywność fluorescencji w górnych i dolnych strefach warstwy lipidowej. Taki wynik wskazuje na planarną orientację przejścia dipolowego związku w stosunku do płaszczyzny błony, co potwierdzono obliczeniami kąta pomiędzy kierunkiem przejścia dipolowego badanego związku wbudowanego w warstwę lipidową GUV a osią normalną do płaszczyzny błony. Wartość kąta wynosiła 58,9 ± 1,2° i była znacznie większa niż wartość kąta magicznego. Ponadto, wykazano, że czasy życia fluorescencji lenzozydu Aβ w etanolu oraz membranach GUV (pomiędzy 3,4 a 3,9 ns) były podobne. Takie wyniki sugerują, że cząsteczka związku znajduje się w rejonie polarnym główó fosfolipidów. Otrzymane wyniki są zgodne z obserwacjami innych autorów opartymi na stymulacji dynamiki molekularnej, która dotyczyła położenia i orientacji kwercetyny oraz jej pochodnych w dwuwarstwowych systemach błon lipidowych [Kosinova i in., 2012]. Badania Kosinovej i jej zespołu wykazały, że głębokość penetracji pochodnych kwercetyny zależy przede wszystkim od rodzaju podstawników obecnych w cząsteczce związku oraz ładunku cząsteczki. Lokalizacja flawonoidów w błonie jest również silnie uzależniona od pH. W niższym pH związki te położone są w głębszych warstwach błony. Z kolei, w obecności naładowanych podstawników takich jak siarczany i glukuronidy, cząsteczki lokalizują się przy powierzchni błony. Kluczowym elementem warunkującym orientację związków polifenolowych jest rodzaj ugrupowań obecnych w ich strukturze. Z literatury wynika, że wiązania wodorowe tworzone są najczęściej pomiędzy grupami polarnymi głów lipidowych a grupami hydroksylowymi, podstawnikami cukrowymi oraz resztami siarczanowymi [Kosinova i in., 2012]. W strukturze LAβ obecne są zarówno grupy hydroksylowe jak i reszty cukrowe. Tak więc spełnione są warunki wspomnianej wyżej i sprzyjające takiej lokalizacji badanego związku. Umiejscowienie badanego flawonoidu w rejonie głów polarnych fosfolipidów oraz jego równoległa orientacja w stosunku do płaszczyzny błony sugerują, że może on działać jako filtr promieniowania krótkofalowego i chronić komórki przed uszkodzeniami związanymi z fotojonizacją.

Z dostępnych źródeł literaturowych wynika, że zmiana właściwości lipidów błonowych przez flawonoidy może modulować aktywność białek integralnych i w konsekwencji wpływać na transport w membranach. Jak wykazano w niniejszej pracy, LAβ

wbudowuje się w rejon polarnych głów fosfolipidów i zmienia dynamiczne właściwości dwuwarstwy lipidowej. Z tego względu zbadano jego wpływ na aktywność kanałów potasowych obecnych w komórkach fibroblastów za pomocą techniki patch-clamp. Kanały te zidentyfikowano na podstawie otrzymanej krzywej prądowo-napięciowej. Po 24-godzinnej inkubacji badanych komórek z LAβ obserwowano wzrost prawdopodobieństwa otwarcia tych kanałów. Potwierdziły to również histogramy amplitud rejestrowanych prądów stworzone na postawie 18 s zapisów. Kwercetyna, której pochodną jest lenzozyd Aβ również wpływa na aktywność kanałów potasowych. Cogolludo i współpracownicy przy pomocy techniki patch-clamp wykazali, że flawonol aktywuje kanały potasowe o dużym przewodnictwie aktywowane jonami Ca^{2+} (BK_{Ca}) obecne w miocytach z tętnic wieńcowych szczurów [Cogolludo i in., 2007]. Inne badania ujawniły, że kwercetyna powoduje hiperpolaryzację komórek śródbłonka poprzez aktywację kanałów BK_{Ca} [Kuhlman i in., 2005]. Podobne wyniki otrzymał zespół Kampy w doświadczeniach dotyczących wpływu, innego flawonoidu- naryngeniny, na mitochondrialne kanały potasowe fibroblastów skóry człowieka. Mikromolarne stężenia związku powodowały wzrost aktywności zarówno mitochondrialnych kanałów potasowych o dużym przewodnictwie regulowanych przez jony Ca^{2+} (mitoBK_{Ca}) jak również mitochondrialnych kanałów regulowanych przez ATP (mito$K_{ATP.}$). Ponadto w obecności naryngeniny wzrosło prawdopodobieństwo otwarcia kanałów mitoBK_{Ca}. Wydaje się, że aktywacja mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego ATP, jest związana z cytoprotekcyjnym efektem w stosunku do komórek. Z kolei zahamowanie kanału Kv1.3 może prowadzić do śmierci komórek nowotworowych [Kampa i in., 2019].

Kolejnym etapem pracy doktorskiej było określenie wpływu lenzozydu Aβ na lipidowe i białkowe składniki komórek. W tym celu wykorzystano technikę FITR, która pozwala na analizę składników komórkowych takich jak lipidy, białka oraz kwasy nukleinowe. Jest również dobrym narzędziem służącym do badania złożonych systemów biologicznych takich jak tkanki, komórki czy mikroorganizmy [Mihoubi in., 2017]. Badania były prowadzone na dwóch liniach nowotworowych: raka szyjki macicy (HeLa) i raka krtani (Hep-2) człowieka oraz na linii komórek prawidłowych jaką były fibroblasty skóry człowieka (HSF). W widmach ATR-FTIR komórek dominowały dwa pasma odpowiadające regionom amidu I (1600-1700 cm^{-1}) i amidu II (1510-1580 cm^{-1}). Pasmo amidu I dostarcza informacji na temat ogólnej drugorzędowej struktury białek obecnych w komórkach [Rigas i Wong, 1992; Surewicz i Mantsch, 1988; Liu i in., 2001] a poszczególne pasma reprezentują

różne struktury drugorzędowe takie jak: antyrównoległe β-kartki (1675-1695 cm^{-1}), α-helisy (1648-1660 cm^{-1}), β-kartki (1625-1640 cm^{-1}), struktury nieuporządkowane (1652-1660 cm^{-1}) oraz skręty (1660-1685 cm^{-1}) [Tamm i Tatulian, 1997]. W komórkach linii HeLa, po 24 godzinnej inkubacji, badany związek oddziaływał zarówno z lipidami i jak białkami komórek. Dodanie flawonoidu spowodowało zmniejszone przyłączanie cząsteczek wody przez komórki. W rejonie lipidowym komórek obserwowano silny efekt. Obserwowano bowiem wzrost intensywności pasm odpowiadających drganiom rozciągającym segmentu C-O-P-O-C (1056 cm^{-1}) oraz pasm odpowiadających drganiom symetrycznym rozciągającym grup – PO_2^- (1082 cm^{-1}). Takie obserwacje wskazują wyraźnie na oddziaływanie flawonoidu z grupami polarnymi głów cholinowych fosfolipidów za pomocą wiązań wodorowych. Może to wynikać z faktu, że rejon odpowiadający drganiom symetrycznym rozciągających grup – PO_2^- jest bardzo wrażliwy na wiązania wodorowe oraz interakcje z substancjami [Tamm i Tatulian, 1997]. Taki efekt - silne interakcje badanego związku z regionem głów polarnych fosfolipidów za pomocą wiązań wodorowych, wykazano w tej pracy na modelowych błonach sporządzonych z DPPC technikami FTIR i NMR. Okazuje się, że badany flawonoid wchodzi w interakcje i wbudowuje się do polarnej strefy głów lipidowych w ludzkich komórkach nowotworowych raka szyjki macicy. Lenzozyd Aβ zmienił również profil spektralny białek badanych komórek w regionie amidu I. Jak wykazały pomiary, spowodował on obniżenie ilości białek. Analiza wykazała, że flawonoid zmniejszył ilość struktur typu skręty jednocześnie zwiększając ilość struktur typu β-kartki. Wdaje się, że może on powodować częściową agregację białek. Po 48 godzinach traktowania badanych komórek LAβ, badany flawonoid spowodował wyraźne obniżenie względnej ilości białek. Wzrosła ilość nieuporządkowanych struktur białkowych oraz struktur typu pętle i skręty na niekorzyść struktur białkowych typu β-kartki. Takie wyniki mogą wskazywać na fakt, że po dłuższym czasie inkubacji związek ten hamuję syntezę białek oraz powoduje ich częściową denaturację. Istnieje także inne wytłumaczenie związane z indukcją apoptozy w komórkach HeLa przez Laβ. W tym procesie dochodzi bowiem do modyfikacji istniejących białek. Podobne wyniki uzyskali badacze zajmujący się działaniem naturalnego produktu pochodzącego z moczu wielbłąda (PM 701) na komórki nie drobnokomórkowego raka płuc linii A549. Indukcji apoptozy towarzyszyły zmiany, podobne do uzyskanych w badaniach własnych, w widmach ze strefy amidu I. W początkowych etapach apoptozy, badacze tego zespołu obserwowali zwiększenie ilości struktur typu β-kartki. Po czym nastąpił wzrost ilości struktur nieuporządkowanych [Ahmed

i in., 2009]. Z kolei Elmadany i współpracownicy w badaniach na wpływem synergistycznego działania kwercetyny i doksorubicyny na komórki raka piersi MCF-7 wykazali, że terapia skojarzona tych dwóch związków powoduje obniżenie ilości białka oraz zmiany w rejonie amidu I. Zmniejszyła się ilość struktur typu α-helisy a wzrosła ilość agregatów β-kartek. Stwierdzono, że jednoczesne działanie kwercetyny i doksorubicyny na komórki MCF-7 powoduje nieprawidłowe fałdowanie białek oraz ich agregację, co w efekcie wywołuje apoptozę [Elmadany i in., 2018].

Po 24-godzinnej inkubacji komórek raka krtani z LAβ obserwowano, podobnie jak w komórkach HeLa, jedynie zmniejszone przyłączanie cząsteczek wody przez badane komórki. Natomiast po dłuższym czasie inkubacji (48 godzin) odnotowano wyraźne zmiany w stosunku do białek i lipidów komórek Hep-2. Podobnie jak w komórkach HeLa oraz modelowych błonach DPPC, badany flawonoid oddziaływał z rejonem głów polarnych fosfolipidów za pomocą wiązań wodorowych. Ponadto zwiększył ilość struktur drugorzędowych białek typu β-kartki i antyrównoległe β-kartki. Jednocześnie obniżył ilość α-helis i nieuporządkowanych struktur białkowych. W odniesieniu do prawidłowych komórek tj. ludzkich komórek fibroblastów skóry, LAβ spowodował niewielkie działanie usztywniające frakcji lipidowej strefy głów polarnych oraz wytworzenie dodatkowych białek.

Na podstawie analizy widm FTIR można przypuszczać, że LAβ silnie wpływa na białka komórkowe. Jest prawdopodobne, że taki efekt może wynikać z interakcji lenzozyd-białka, co w rezultacie prowadzi do zerwania wiązań wodorowych, stabilizujących struktury drugorzędowe. Z drugiej strony, jak wykazały badania tej pracy doktorskiej, badany flawonoid indukował apoptozę komórek. Tak więc dane otrzymane na podstawie analiz FTIR, pozwalają w części wytłumaczyć i zasugerować biochemiczne i biofizyczne zmiany w strukturach białek komórkowych, w tym białek błonowych, zachodzące po traktowaniu komórek lenzozydem Aβ. Bowiem takie zmiany ilościowe i jakościowe białek mogą zachodzić w wyniku wielu mechanizmów: przez rozpad białek powodowany przez różne kaspazy, modulację aktywności czaperonu czy funkcji proteasomu. Wszystkie te zmiany wpływają na proces fałdowania (zwijania) białek i ich lokalizacje, co w efekcie zmienia absorpcje IR wiązań peptydowych [Gaspari i Muzio, 2003].

Na podstawie literatury wiadomo, że związki naturalne w tym flawonoidy, wykazują działanie cytotoksyczne na komórki nowotworowe. Wiążą się one z błoną komórkową,

wnikają do komórek hodowanych *in vitro* oraz modulują ich aktywność metaboliczną. Przeciwnowotworowe działanie flawonoidów jest w dużej mierze związane z hamowaniem proliferacji, inaktywacją karcynogenów, zatrzymaniem cyklu komórkowego, indukcją apoptozy jak również zahamowaniem angiogenezy i przerzutów. Komórki nowotworowe charakteryzują się zmniejszoną zdolnością do apoptozy w odpowiedzi na niektóre bodźce fizjologiczne. Obecnie poszukuje się substancji, które mogą specyficznie wywoływać apoptozę w tych komórkach. Takimi zdolnościami charakteryzują się właśnie niektóre flawonoidy. Jak wyżej wspomniano, są cytotoksyczne w stosunku do różnych, ludzkich komórek nowotworowych a jednocześnie nie wpływają lub wpływają w niewielkim stopniu na komórki prawidłowe [Plochmann i in., 2007; Sghaier i in., 2011].

Dlatego kolejnym etapem badań było określnie cytotoksycznych właściwości lenzozydu Aβ w stosunku do komórek nowotworowych i prawidłowych oraz sprawdzenie czy badany związek indukuję śmierć komórkową. Wyniki uzyskane, za pomocą testu czerwieni obojętnej oraz testu LIVE/DEAD, były zgodne i wykazały, zależne od linii komórkowej obniżenie żywotności komórek. Najsilniej lenzozyd Aβ zadziałał na komórki raka szyjki macicy człowieka. W niewielkim stopniu obniżył żywotność komórek raka krtani, zarówno po 24 jak i 48-godzinnej inkubacji. Fibroblasty skóry człowieka nie były wrażliwe na działanie badanego flawonoidu, z wyjątkiem silnej dawki (50 µg/ml), w której obserwowano niewielkie działanie cytotoksyczne. Tak więc uzyskane wyniki uzupełniają i wpisują się w cytotoksyczne działanie flawonoidów, skorelowane często z działaniem antyproliferacyjnym i indukcją apoptozy w komórkach. Lenzozyd Aβ jest pochodną kwercetyny, która jest związkiem o silnym działaniu cytotoksycznym. Liczne dane literaturowe wykazują, ze związek ten indukuje apoptozę komórek takich nowotworów jak: rak żołądka [Yoshida i in., 1990], rak piersi [Choi i in., 2001], rak jelita grubego [Richter i in., 1999], rak jamy ustnej [ElAttar i in., 1999], rak wątroby [Wang i in., 2012], rak prostaty [Nair i in., 2004], rak tarczycy [Mutlu Altundağ i in., 2016], białaczki [Lee i in. 2006], rak trzustki [Angst i in., 2013] i rak płuca [Zheng i in., 2012]. W pracy doktorskiej, wykazano zróżnicowaną wrażliwość badanych komórek na działanie badanego flawonoidu, co można wytłumaczyć na podstawie dostępnych źródeł literaturowych. Wynika z nich, że flawonoidy w zależności od struktury wykazują różnice we wrażliwości i selektywności względem komórek nowotworowych [Morales i Haza, 2012; Nagao i in., 2002]. Wykazano również, że obecność reszt cukrowych w cząsteczce flawonoidów, w znacznym stopniu wpływa na ich cytotoksyczne właściwości [Sak, 2014]. Ważne jest też pochodzenie tkanki nowotworu,

które determinuje jego wrażliwość na flawonoidy [Li-Weber, 2009; Himeji i in., 2007] jak również etiologia choroby [Chen i in., 2000]. Dlatego flawonoidy mogą wykazywać, w różnym stopniu cytotoksyczne działanie wobec wybranych typów nowotworów [Kilani-Jaziri i in., 2012, Ikezoe i in., 2001]. W stosunku do prawidłowych komórek, lenzozyd Aβ, jedynie w najwyższej dawce wykazał subtelne działanie. Cytotoksyczne działanie niektórych flawonoidów w zależności od dawki, wobec prawidłowych komórek embrionalnych fibroblastów z płuc ludzkich (TIG-1) oraz komórek endotelialnych izolowanych z żyły pępowinowej (HUVEC), wykazał zespół Matsuo i współautorów. Autorzy ci wytłumaczyli takie działanie wobec komórek, generowaniem reaktywnych form tlenu pod wpływem wysokich stężeń flawonoidów [Matsuo i in., 2005].

Kolejnym aspektem niniejszej pracy, była próba określenia mechanizmu aktywności cytotoksycznej LAβ wobec badanych komórek. Dlatego oceniano zdolność badanego związku do indukcji zaprogramowanej śmierci komórkowej. W badaniach zastosowano barwienie komórek jodkiem propidionowym i barwnikiem Hoechst33342 oraz, w celu porównania i uzupełnienia danych, analizę cytometryczną. Jak wykazały badania własne, badany flawonol indukował apoptozę komórek linii HeLa na poziomie 10-15%. Z kolei w linii Hep-2 obserwowano niewielką ilość komórek apoptotycznych. Natomiast LAβ nie indukował zaprogramowanej śmierci w komórkach prawidłowych. Jednocześnie LAβ nie indukował lub w niewielkim stopniu indukował nekrotyczną śmierć wszystkich badanych komórek.

Apoptoza określana również jako zaprogramowana śmierć komórki (ang. PCD-programmed cel death) występuję zarówno w warunkach fizjologicznych komórek jak również jest indukowana przez różne substancje. Jest to proces uporządkowany, przebiegający według ściśle określonego schematu, którego celem jest eliminacja uszkodzonych i starych komórek [Helewski i in., 2006]. Zjawisku temu towarzyszy wiele zmian zarówno na poziomie morfologicznym jak i biochemicznym [Żebrowski i in., 2001; Maciorkowska i in., 2008, Helewski i in., 2006]. Zaprogramowana śmierć dotyczy zazwyczaj pojedynczych komórek. Takie komórki oddzielają się od innych komórek i stopniowo tracą wodę, co prowadzi do ich obkurczenia. Obkurczona komórka traci następnie kontakt z pozostałymi komórkami. Kolejną cechą charakterystyczną dla apoptozy jest zagęszczenie chromatyny jądrowej i jej gromadzenie w pobliżu błony jądrowej oraz zmniejszenie rozmiarów jądra. Równocześnie obserwuje się zmiany w budowie błony komórkowej, która tworzy uwypuklenia. Powstają tzw. ciałka apoptotyczne, które otoczone

są błoną komórkową a w ich wnętrzu znajdują się fragmenty chromatyny oraz organelle komórkowe [Helewski i in., 2006; Maciorkowska i in., 2008; Hordyjewska i Pasternak, 2005; Tsan i Goa, 2009].

Aby określić czy komórki poddane działaniu lenzozydu Aβ mają cechy komórek apoptotycznych wykonano pomiary morfometryczne takie jak ich: długość, szerokość, średnica, obwód oraz pole powierzchni. Ponadto za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej oceniono zmiany w morfologii badanych komórek. Dodatkowo oceniono ultrastrukturę badanych komórek pod wpływem działania flawonoidu. LAβ powodował zmiany parametrów morfometrycznych zarówno komórek linii HeLa jak i Hep-2. W komórkach inkubowanych z lenzozydem Aβ, wszystkie badane parametry uległy zmniejszeniu w porównaniu z kontrolą. Ponadto, zaobserwowano zmniejszenie ilości tzw. komórek i jąder jasnych. Nastąpił natomiast wzrost liczby tzw. komórek i jąder ciemnych czyli charakteryzujących się zagęszczoną cytoplazmą. Podobne zmiany wykazano w badaniach zespołu Priyadarsini i współautorów. Komórki HeLa poddane działaniu kwercetyny, którego pochodną jest LAβ, były obkurczone, miały skondensowaną chromatynę i pofragmentowane jądro komórkowe [Priyadarsini i in., 2010]. Podobne wyniki otrzymali także inni badacze, których obiektem doświadczalnym były komórki linii Hep2. Wykazali oni indukcję apoptozy przez kwercetynę, która stanowi rdzeń cząsteczki LAβ. Zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M powodowało zagęszczanie chromatyny i następnie fragmentację DNA [Ferrandina i in., 1998].

Analiza komórek nowotworowych i prawidłowych z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) pozwoliła na ocenę morfologii komórek i potwierdziła liczne zmiany w topografii ich powierzchni, a wśród nich zmiany charakterystyczne dla procesu apoptozy. Wyjątkiem były komórki prawidłowe fibroblastów skóry traktowane lenzozydem Aβ, które zachowały prawidłową morfologię, były wydłużone i ściśle przylegały do podłoża. Komórki hodowli kontrolnych linii HeLa i Hep-2 wykazywały typową i charakterystyczną dla nich morfologię. Hodowle te były gęste a komórki wydłużone, adherentne i posiadały liczne mikrokosmki. Zaś komórki poddane działaniu Laβ, ujawniły wyraźne zmiany w morfologii. Zmniejszyła się ilość komórek oraz połączeń pomiędzy nimi. Komórki były obkurczone i nie przylegały ściśle do podłoża. Obserwowano zmniejszenie ilości lub całkowitą utratę mikrokosmków. W niektórych komórkach widoczne były też ciałka apoptotyczne. Literatura podaje liczne dane dotyczące zmian w komórkach pod wpływem kwercetyny, której pochodną jest lenzozyd Aβ. Zmiany charakterystyczne dla

komórek apoptotycznych obserwowali Talib i współpracownicy, którzy zajmowali się badaniem wpływu metylowych pochodnych kwercetyny wyizolowanych z *Inula viscosa,* na komórki raka piersi linii MCF-7. Podobnie, jak w badaniach niniejszej pracy, komórki poddane działaniu flawonoidów były obkurczone i miały zredukowaną liczbę mikrokosmków. Obserwowano również powstawanie uwypukleń błony oraz utratę kontaktu pomiędzy sąsiednimi komórkami jak również powstawanie ciałek apoptotycznych [Talib i in., 2012]. Wpływ flawonoidów na komórki raka piersi MCF-7 analizowali również inni badacze. Wang i współpracownicy wykazali, że w zależności od stężenia flawonoidy powodują obkurczenie komórek oraz redukcję ilości lub całkowitą utratę mikrokosmków [Wang i in., 2016]. Z kolei Zhang i współbadacze potwierdzili, że kwercetyna w komórkach raka szyjki macicy indukuję apoptozę oraz wpływa na morfologię tych komórek. W zależności od stężenia i czasu inkubacji obserwowano zmiany w ich strukturze takie jak: redukcja ilości mikrokosmków, obkurczenie komórek oraz powstawanie ciałek apoptotycznych [Zhang i in., 2007]. Podobne wyniki badań dotyczących linii MCF-7 i MDA-MB-231 traktowanych eupatoryną, otrzymali inni badacze. Zmiany obserwowane w komórkach były skorelowane z regulacją proapoptotycznych białek Bad i Bax oraz aktywacją kaspazy 9 [Razak i in., 2019].

Zmiany kształtu komórek, po traktowaniu flawonoidami, można tłumaczyć ich wpływem na białka cytoszkieletu, w tym aktynę oraz białka sieciujące. Jedną z cech charakterystycznych adherentnych komórek nabłonkowych są lamellipodia. Struktury te są złożone z włókien aktynowych a ich organizacja jest regulowana za pomocą białek sieciujących, wiążących i tnących. W badaniach Majumdara i współautorów, na modelu ludzkich komórek czerniaka, obserwowano obecność komórek, które nie wykazywały ekspresji białka sieciującego APB280. Wykazano, że takie komórki nie tworzyły lamellipodów a na ich powierzchni powstawały kuliste pęcherzyki. Stwierdzono więc, że zaburzenia kształtu komórek i występowanie uwypukleń na powierzchni błon mogą być wytłumaczone dysfunkcją włókien aktynowych [Majumdar i in. 2001]. Takie same wnioski można wyciągnąć na podstawie badań Lee i współautorów. Badacze ci zajmowali się działaniem skojarzonej terapii chlorowodorku 7-[1-(5-jodonaftaleno1-sulfonylo)-1H-heksahydro-1,4-diazepiny (ML-7) i kwercetyny na komórki ludzkiej ostrej białaczki promielocytowej HL-60. Wykazano w tych doświadczeniach, że flawonoid zwiększał cytotoksyczne działanie inhibitora MLCK poprzez wiązanie się do aktyny, a w efekcie komórki posiadały fenotyp komórek apoptotycznych [Lee i in., 2009]. Z kolei inne badania

sugerują, że hamowanie białek związanych z organizacją cytoszkieletu, indukuje zmiany w dynamice aktyny i prowadzi do wzrostu reaktywnych form tlenu. W rezultacie dochodzi do śmierci komórkowej [Farah i Amberg, 2007]. Badania niniejszej pracy wykazały indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach HeLa i Hep-2 poddanych działaniu LAβ. Formowanie uwypukleń błony oraz ciałek apoptotycznych, zmiany które obserwowano w tej pracy doktorskiej, może być związane z inaktywacją kinazy płytek przylegania FAK. Kinaza ta odgrywa rolę w wielu procesach komórkowych takich jak adhezja, regulacja cyklu komórkowego, migracja, fosforylacja białek cytoszkieletu oraz apoptoza. Zwiększona ekspresja tego białka w komórkach raka jest związana z ich zdolnością do zwiększonej migracji, inwazji i tworzenia przerzutów [Totoń i Rybczyńska, 2007]. Z kolei inaktywacja tej kinazy powoduje zaburzenia przyczepności komórek oraz ich odrywanie od podłoża i sąsiednich komórek [Varner, Cheresh, 1996]. Nie można zatem wykluczyć, że badany w tej pracy związek, wpływa na różne białka, w tym białka cytoszkieletu czy białka membran oraz inne. Badania Pawlikowskiej-Pawlęgi i współbadaczy dowiodły, że kwercetyna, która stanowi rdzeń cząsteczki badanego w tej pracy flawonoidu, wiążąc się do białek cytoszkieletu czerwonych krwinek człowieka zmienia ich kształt [Pawlikowska-Pawlęga i in., 2003]. W niniejszej pracy analizując widma FTIR, wykazano działanie badanego związku na białka komórek linii Hela i Hep- 2 i jednocześnie obserwowano zmiany w morfologii tych komórek. Z drugiej strony odmienne lub niewielkie działanie w tym aspekcie, odnotowano dla linii komórek prawidłowych czemu nie towarzyszyły żadne zmiany w morfologii komórek na poziomie mikroskopii świetlnej, elektronowej i fluorescencyjnej.

W celu uzupełnienia danych uzyskanych w badaniach dotyczących morfologii badanych komórek i potwierdzenia indukcji apoptozy przez badany flawonoid, w kolejnym etapie badań określono wpływ LAβ na ich ultrastrukturę. Badania prowadzone za pomocą techniki transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazały, w komórkach linii HeLa jak i Hep-2 wyraźne zmiany. W wielu komórkach jądra były obkurczone i miały nieregularny kształt a w ich obszarze obserwowano skondensowaną chromatynę. W cytoplazmie pojawiły się skondensowane mitochondria oraz autofagosomy i autolizosomy. Komórki wykazywały wakuolizację. W komórkach raka szyjki macicy obserwowano również uwypuklenia błony i redukcję mikrokosmków. Z kolei w komórkach prawidłowych, poddanych działaniu Laβ, nie wykazano wcale lub bardzo niewielkie zmiany w ultrastrukturze. Większość komórek miała duże centralnie położone jądra z widocznym jąderkiem. W cytoplazmie obserwowano

liczne rybosomy, skondensowane mitochondria oraz wyraźne cysterny retikulum endoplazmatycznego. Zmiany obserwowane w niniejszej pracy w komórkach linii nowotworowych poddanych działaniu lenzozydu Aβ, są charakterystyczne dla komórek wchodzących na drogę apoptozy. Podobne zmiany obserwowali w swoich badaniach Mita i współautorzy [Mita i in., 2003]. Po inkubacji komórek ludzkiej białaczki monoblastycznej U937 z medium indukującym apoptozę, wykazali oni obecność obkurczonych komórek oraz kondensację chromatyny w pobliżu obwodu ich jąder a następnie ich fragmentację. Odnotowali oni również zjawisko skracania mikrokosmków, które po dłuższym czasie zanikały. W cytoplazmie takich komórek widoczne były liczne wakuole. Zmiany ultrastrukturalne, wykazane w niniejszej pracy, czyli obecność skondensowanej chromatyny, uwypuklenia błony oraz liczne autofagosomy wykazali też inni badacze, którzy działali kwercetyną, na komórki raka piersi [Ranganathan i in., 2015].

Zmiany kształtu i morfologii, parametrów morfometrycznych i towarzyszące im zmiany na poziomie ultrastruktury badanych komórek raka szyjki macicy i raka krtani człowieka, zaobserwowane w badaniach własnych, mogą być wynikiem zmian w strukturze i właściwościach błony komórkowej. Jak wykazały badania własne lenzozyd Aβ inkorporuje się do błon i zmienia ich parametry biofizyczne.

Ostatnie badania ujawniły, że przeciwnowotworowe działanie niektórych flawonoidów może być związane z ich prooksydacyjnym działaniem. Związki te poprzez zaburzenie procesów oksydacyjnych w komórkach i generowanie reaktywnych form tlenu mogą indukować apoptozę komórek nowotworowych [Habtemarium i Dagne, 2010; Li i in., 2008]. Badania własne wykazały, że lenzozyd Aβ powoduje programowaną śmierć komórek linii HeLa i Hep-2. Dlatego też postanowiono określić wpływ badanego związku na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach. Stres oksydacyjny jest to stan, w który zostaje zaburzona równowaga pomiędzy procesami pro-oksydacyjnymi a antyoksydacyjnymi. Wiąże się on z dużym poziomem reaktywnych form tlenu, które utleniając białka, tłuszcze i DNA uszkadzają tkanki. Jak wynika z licznych danych literaturowych flawonoidy działają antyoksydacyjne. Wielu autorów sugeruje, że jest to związane z ich działaniem na powierzchni błony [Oteiza i in., 2005]. Z drugiej strony, usztywniające działanie niektórych polifenoli, może zwiększać prawdopodobieństwo interakcji pomiędzy kwasami tłuszczowymi a lipidowymi rodnikami prowadząc w rezultacie do utleniania lipidów [Verstraeten i in., 1997; Verstraetten i Oteiza, 2000]. Jak wykazano w badaniach własnych, lenzozyd Aβ indukował stres oksydacyjny wyłącznie w komórkach linii HeLa i Hep-2 zaś

w komórkach prawidłowych obniżył jego poziom. Takie dualistyczne działanie wykazano również dla kwercetyny, której pochodną jest LAβ. W zależności od stężenia, umiejscowienia w komórce oraz źródła wolnych rodników, kwercetyna działała zarówno pro- jak i antyoksydacyjnie [Kobylińska i Janas, 2015]. W badaniach dotyczących jej wpływu na komórki ludzkich linii wątrobiaka HepG2 i HA22T/VGH kwercetyna działała antyoksydacyjne i hamowała generowanie rodników tlenowych. Natomiast w wyższych stężeniach i po dłuższym czasie inkubacji generowała rodniki. W konsekwencji zaburzała mitochondrialny potencjał błonowy, powodowała wypływ cytochromu c i indukowała apoptozę [Bird, 2002; Gehring i in., 2009]. Podobnie inne flawonoidy (apigenina, epigalokatechina oraz genisteina), jak wykazał Das i jego zespół, generują syntezę ROS a przez to wywołują apoptozę w komórkach glejaka wielopostaciowego [Das i in., 2010]. Tak więc działanie antyutleniające flawonoidów zależy od stężenia związku, typu komórki oraz warunków hodowli [Matsuo i in., 2005].

Podsumowując, badania w ramach niniejszej rozprawy wykazały zdolność, niepoznanego dotąd, lenzozydu Aβ do wchodzenia w interakcje zarówno z modelowymi błonami sporządzonymi z DPPC jak również z białkowymi i lipidowymi składnikami badanych komórek. Badany związek lokalizuje się w rejonie głów polarnych fosfolipidów i tworzy wiązania wodorowe z ugrupowaniem C–O–P–O–C. W znacznym stopniu zmienia on strukturalne i dynamiczne właściwości badanych błon oraz aktywność kanałów potasowych komórek prawidłowych. Ponadto, LAβ wykazuje działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek, zwłaszcza komórek HeLa i indukuje ich apoptozę. Oddziałując na lipidy i białka komórek nowotworowych, zmienia ich morfologię, ultrastrukturę oraz parametry morfometryczne. Badany związek wykazuje antyoksydacyjną aktywność w stosunku do komórek prawidłowych i jednocześnie pro-oksydacyjnie działanie na komórki nowotworowe, co prowadzi do ich apoptozy. Uzyskane wyniki dostarczają istotnych informacji na temat mechanizmów oddziaływania lenzozydu Aβ z błonami komórkowymi oraz skutków tych interakcji w komórkach. Mogą być podstawą do terapeutycznego zastosowania zawiązku w leczeniu nowotworów oraz innych chorób. Jednak konieczne są dalsze, bardziej szczegółowe badania.

VI. Wnioski

1. Badania interakcji lenzozydu Aβ z modelowymi błonami lipidowymi utworzonymi z dipalmitylofosfatydylocholiny (DPPC) wskazują na istotny wpływ badanego związku na dwuwarstwę lipidową:
   a) Lenzozyd Aβ wbudowuje się do liposomów uformowanych z DPPC i wiąże się z głowami polarnymi lipidów za pomocą wiązań wodorowych pomiędzy ugrupowaniem C–O–P–O–C a grupami hydroksylowymi flawonoidu
   b) Badany związek wykazuje działanie usztywniające na błony, co może mieć istotne znaczenie dla jego biologicznych aktywności
   c) Flawonoid zmienia (modyfikuje) własności fizyczne dwuwarstw lipidowych przejawiające się w formowaniu liposomów wielowarstwowych o większych rozmiarach
   d) Planarna orientacja badanego związku w stosunku do płaszczyzny dwuwarstwy lipidowej sugeruje, że może on działać jako filtr promieniowania krótkofalowego i chronić komórki przed uszkodzeniami związanymi z fotojonizacją.

2. Lenzozyd Aβ oddziałuje na poziomie molekularnym z komórkami raka szyjki macicy (HeLa) i raka krtani (Hep-2):
   a) Badany flawonoid wchodzi w interakcje z lipidami komórek w obszarze głów cholinowych fosfolipidów poprzez tworzenie wiązań wodorowych z grupami —PO_2^- oraz ugrupowaniem C-O-P-O-C głów polarnych.
   b) Lenzozyd Aβ zmienia profil spektralny białek badanych komórek, co przejawiło się zmianami w regionie amidu I, zmianami ich struktury drugorzędowej oraz obniżeniem względnej ilości białek
   c) Dłuższy czas inkubacji z flawonoidem hamuje prawdopodobnie syntezę białek oraz powoduje ich częściową denaturację i agregację.

3. Badany flawonoid odmiennie oddziałuje, na poziomie molekularnym, na komórki prawidłowe linii HSF. Wykazuje niewielkie działanie usztywniające wobec frakcji lipidowej głów cholinowych oraz indukuje wytworzenie dodatkowych białek.

4. Zmiany we właściwościach lipidów badanych komórek prawidłowych przez lenzozyd Aβ jak również jego wpływ na białka, mogą modulować aktywność białek integralnych zaangażowanych w transport błonowy, co ujawniło się zwiększonym prawdopodobieństwem otwierania się kanałów potasowych w tych komórkach i zmianą ich aktywności.

5. Badany związek w niewielkim stopniu obniża przeżywalność komórek. Jego cytotoksyczne działanie skorelowane jest z indukcją apoptozy, choć w niewielkim stopniu, w komórkach nowotworowych.

6. Efektem działania lenzozydu Aβ na komórki nowotworowe są wyraźne zmiany w ich morfologii i ultrastrukturze charakterystyczne dla procesu apoptozy. Zmienia on parametry morfometryczne, topografię powierzchni oraz strukturę wewnętrzną badanych komórek.

7. Zmiany kształtu i morfologii, parametrów morfometrycznych i towarzyszące im zmiany na poziomie ultrastruktury badanych komórek raka szyjki macicy i raka krtani człowieka, zaobserwowane w badaniach własnych, mogą być wynikiem zmian w strukturze i właściwościach błony komórkowej. Jak wykazały badania własne lenzozyd Aβ inkorporuje się do błon i zmienia ich parametry biofizyczne.

8. Komórki prawidłowe wykazują odmienną wrażliwość na działanie lenzozydu Aβ, który nie zmienia ich morfologii oraz ultrastruktury. Jednocześnie nie wywołuje programowanej śmierci w komórkach i wykazuje w nich działanie anty-utleniające.

9. Lenzozyd Aβ indukuje stres oksydacyjny w komórkach linii HeLa i Hep-2, co może mieć zastosowane w eliminacji komórek po zahamowaniu ich obrony antyoksydacyjnej.

VII. Bibliografia

1. Ader P., Blöck M., Pietzsch S., Wolffram S., 2001, Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1), *Cancer Letter*, 162 (2), 175-180.

2. Agarwal R., Katiyar S.K., Lundgren D.W., Mukhtar H., 1994, Inhibitory effect of silymarin, an anti-hepatotoxic flavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice, *Carcinogenesis*, 15 (6), 1099-1103.

3. Agati G., Brunetti C., Di Ferdinando M., Ferrini F., Pollastri S., Tattini M., 2013, Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past, *Plant physiology and Biochemistry*, 72, 35-45.
4. Ahmed G.A.R., Khorshid F.A.R., Kumosani T.A., 2009, FT-IR spectroscopy as a tool for identification of apoptosis-induced structural changes in A549 cells treated with PM 701, *International Journal of Nano and Biomaterials*, 2, 396-408.
5. Al Aboody M.S., Mickymaray S., 2020, Anti-fungal efficacy and mechanism of flavonoids, *Antibiotics*, 9 (2), 45.

6. Allen T.M., Cullis P.R., 2013, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (1), 36-48.
7. Alves A.C., Ribeiro D., Nunes C., Reis S., 2016, Biophysics in cancer: the relevance of drug-membrane interaction studies, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1858, 2231- 2244.
8. Andreas A., Donovan S.M., Kuhlenschmidt M.S., 2009, Soy isoflavones and virus infections, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20 (8), 563-569.
9. Angelini A., Ilio C.D., Castellani M.L., Conti P., Cuccurullo. 2010, Modulation of multidrug resistance p-glycoprotein activity by flavonoids and honokiol in human doxorubicin- resistant sarcoma cells (MES-SA/DX-5): implications for natural sedatives as chemosensitizing agents in cancer therapy, *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents Archivi* , 24 (2), 197-205.

10. Angst E., Park J.L., Moro A., Lu Q.Y., Lu X., Li G., King J., Chen M., Reber H.A., Go V.L.W., 2013, The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo, *Pancreas*, 42(2), 223.
11. Arct J., Pytkowska K., 2008, Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals, *Clinic in Dermatology*, 26, 347- 357.
12. Arora A., Nair M.G., Strasburg G.M., 1998, Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system, *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1355-1363.
13. Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M., 2000, Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373, 102–109.
14. Austin C.A., Patel S., Ono K., Nakane H., Fisher L.M., 1992, Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives, *Biochemical Journal*, 282 (3), 883-339.
15. Badowska-Kozakiewicz A.M., 2011, Zjawisko oporności wielolekowej w nowotworach – rola glikoproteiny P. *Życie Weterynaryjne*, 86 (3), 211-214.
16. Bailly C., 2000, Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drug, *Current Medical Chemistry*, 7, 39-58.
17. Bărbînţă Pătraşcu M. E., Drăguşin M., Ţugulea L., Meghea A., 2009, Effect of quercetin on artificial lipid membranes, *U.P.B. Scientific Bulletin*, 71 (1), 41-50.
18. Baró L., Hermoso J.C., Núñez M.C., Jiménez- Rios J.A., Gil A., 1998, Abnormalities in plasma and red blood cell fatty acid profiles of patients with colorectal cancer, *British Journal of Cancer*, 77, 1978-1983.
19. Bartnik M., Sławińska-Brych A., Żurek A., Kandefer-Szerszeń M., Zdzisińka B., 2017, 8-methoxypsoralen reduces AKT phosphorylation, induces intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, and suppresses cell growth of SK-N-AS neuroblastoma and SW620 metastatic colon cancer cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 207, 19-29.
20. Batra P., Sharma A.K., 2013, Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives, *3 Biotech 3* (6), 439-359.
21. Beckman C.H., 2000, Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 101–110.

22. Berg J.M., Stryer L., Tymoczko J.L., 2011, Biochemia, PWN, Warszawa.
23. Berra B., Bordoni A., Rapelli S., Biagi P.L., Pezzotta S., Malgrassi L., Montorfano G., Hrelia S., 1994, Altered membrane lipid composition in a human meningosarcoma, *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 24, 54-57.
24. Bird A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16, 6-21
25. Bravo L., 1998, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutrition Reviews*, 56 (11), 317-33.
26. Bryszewska M., Pałecz B., 1994, Kalorymertia skaningowa w badaniu przejść fazowych fosfolipidów i białek, *Folia Biochimica et Biophysica*, 10, 53-69.
27. Cao G., Sofic E., Perior R.L., 1997, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure activity relationship, *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 749-760.
28. Chapman D., 1975, Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes, *Quartely Reviews of Biophysics*, 8(2), 185-235.
29. Chen C.H., Huang L.L., Huang C.C., Lin C.C., Lee Y., Lu F.J., 2000, Baicalein, a novel apoptotic agent for hepatoma cell lines: A potential medicine for hepatoma, *Nutrition and Cancer*, 38, 287–95.
30. Chlebda E., Magdalan J., Merwid-Ląd A., Trocha M., Kopacz M., 2010, Influence of water-soluble flavonoids, quercetin-5′-sulfonic acid sodium salt andmorin-5′-sulfonic acid sodium salt, on antioxidant parameters in the subacute cadmium intoxication mouse model, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, 105-108.
31. Choi J.A., Kim J.Y., Lee J.Y., Kang C.M., Kwon H.J., Yoo Y.D., Kim T.W., Lee Y.S., Lee S.J., 2001, Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin, *International Journal of Oncology*, 19 (4), 837–844.
32. Chowdhury A.R., Sharma S., Mandal S., Goswami A., Mukhopadhyay S., Majumder H.K., 2002, Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochemical Journal*, 366 (2), 653-661.
33. Cogolludo A., Frazziano G., Briones A.M., Cobeno L., Moreno L., Lodi F., Salaices M., Tamargo J., Perez-Vizcaino F., 2007, The dietary flavonoid quercetin activates

BKCa currents in coronary arteries via production of H_2O_2. Role in vasodilatation, *Cardiovascular Research*, 73, 424-431.

34. Cohen AW., Hnasko R., Schubert W., Lisanti M.P., 2004, Role of caveolae and caveolins in health and disease, *Physiological Reviews*, 84(4), 1341–79
35. Cooper J.E., 2004, Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection, *Advances in Botanical. Research*, 41, 2–62.
36. Cushnie T. P.T, Lamb A. J., 2005, Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
37. Cushnie T.P.T., Lamb A.J., 2011, Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 99-107.
38. Cyboran S., Strugała P., Włoch A., Oszmiański J., Kleszczyńska H., 2015, Concentrated green tea supplement: Biological activity and molecular mechanisms, *Life Sciences*, 126, 1–9.
39. Czeczot H., 2000, Biological activities of flavonoids – a review, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 950 (4), 3-13.
40. Dangoria N.S., Breau W.C., Anderson H.A., Cishek D.M., Norkin L.C., 1996, Extracellular simian virus 40 induces an ERK/MAP kinase-independent signalling pathway that activates primary response genes and promotes virus entry, *Journal of General Virology*, 77(9), 2173–2182.
41. Das A., Banik N.L., Ray S.K., 2010, Flavonoids Activated Caspases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells But Not in Human Normal Astrocytes, *Cancer*, 116 (1), 164-176.
42. De Azevedo W.F., Mueller- Dieckmann H.J., Schulze- Gahmen U., Worland P.J., Sausville E., Kim S.H., 1996, Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), 2735- 2740.
43. De la Serna J.B., Schütz G.J., Eggeling C., Cebecauer M., 2016, There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization, *Frontiers in Cell and Developmental Biology 4*, https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00106.
44. Denarie J., Debelle F., Prome J.C., 1996, Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: Signaling molecules mediating recognition and morphogenesis, *Annual Review of Biochemistry*, 65, 503–535.

45. Detsi A., Majdalani M., Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D., Kefalas P., 2009, Natural and syntethic 2’-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization, and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17,8073-8085.
46. Devaux P.F., Zachowski A., 1993, Transmembrane lipid asymmetry in eukaryotes, *NATO ASI Series* , 246, 213-226.
47. Dębiński W., Slagle-Webb B., Achen M.G., Stacker S.A., Tulchinsky E., Gillespie G.Y., Gibo D.M., 2001, VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme, *Molecular Medicine* , 7, 598-608.
48. Drozd J., 2012, Wczoraj i dziś ziołolecznictwa, *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie*, 2, 245-251.
49. Dua J.S., Rana A.C., Bhandari A.K., 2012, Liposome: methods of preparation and applications, *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 3(2), 14-20.
50. Duthie G.G., Gardner P.T., Kyle J.A.M., 2003, Plant polyphenols: are they the new magic bulle? *Proceedings of the Nutrition*, 62, 599-603.
51. Ekiert H., Ekiert R., Muszyńska B., 2014, Nowości dotyczące roślinnych surowców leczniczych w polskich i europejskich monografiach farmakopealnych 2009-2013 Część 1, *Farmakopea Polska*, 70(1), 34-47.
52. El Attar T., Virji A.S., 1999, Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation, *Anticancer Drugs*,10(2), 187–193.
53. Elmadany N., Khail E., Vaccari L., Birarda G., Yousef I., Abu-Dahab R., 2018, Antiproliferative activity of the combination of doxorubicin/quercetin onMCF7 breast cancer cell line: A combined study using colorimetric assay and synchroton infrared microspectroscopy, Infrared Physic & Technology, 95, 141-147.
54. Erlejman A.G., Verstraeten S.V., Fraga C.G., Oteiza P.I., 2004, Interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects, *Free Radical Research*, 38(12), 1311-1320.
55. Eytan G.D., Regev R., Oren G., Assaraf Y.G., 1996, The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation. *Journal of Biological Chemistry,* 271 (22), 12897–902.

56. Fan T.P.D., Jaggar R., Bicknell R ., 1995, Controlling the vasculature: Angiogenesis,ami-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy, *Trends in Pharmacological Sciences,* 16 , 57-66.
57. Farah M.E., Amerg D.C., 2007, Conserved Actin Cysteine Residues Are Oxidative Stress Sensors That Can Regulate Cell Death in Yeast, *Molecular Biology of the Cell*, 18 (4), 1359-1365.
58. Fardid R., Ghorbani Z., Haddadi G., Behzad-Behbahani A., Arabsolghar R., Kazemi E.,Okhovat M.A., Hosseinimehr S.J., 2016, Effects of hesperidin as a radio-protector on apoptosis in rat peripheral Blood lymphocytes after gamma radiation, *Journal of Biomedical Physics Engineering,* 6(4), 217-228.
59. Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M., 1997, Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity, *FEBS Letters* ,416 (2), 123-129.
60. Ferrandina G., Almadori G., Maggiano N., Lanza P., Ferlini C., Cattani P., Piantelli M., Scambia G., Ranelletti F.O., 1998, Growth-inhibitory effect of tamoxifen and quercetin and presence of type ii estrogen binding sites in human laryngeal cancer cell lines and primary laryngeal tumors, *International Journal of Cancer*, 77, 747–754.
61. Fisher K.A., 1976, Analysis of membrane halves: cholesterol, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, 173-177.
62. Florkowska K., Duchnik W., Muzykiewicz A., Zielonka-Brzezicka J., Klimowicz A., 2017, Flawonoidy w profilaktyce i leczeniu miażdżycy, *Problemy Higieny i Epidemiologii*, 98 (3), 217-225.
63. Frezard F., 1999, Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 181–189.
64. Gabrielska J., Soczyńska-Kordala M., Hładyszowski J., Żyłka R., Miśkiewicz J., Przestalski S., 2006, Antioxidative effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenylthin compounds on liposome membranes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7735–7746.
65. Gasparri F., Muzio M., 2003, Monitoring of apoptosis of HL 60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Biochemical Journal*, 369, 239-248.

66. Gehring M., Reik W., Henikoff S., 2009, DNA demethylation by DNA repair, *Trends in Genetics*, 25, 82-89.
67. Gennis, R. B., Biomembranes: Molecular Structure and Function, Springer Verlag, New York, 1989.
68. Golonko A., Kalinowska M., Świsłocka R., Świderski G., Lewandowski W., 2015, Zastosowanie związków fenolowych i ich pochodnych w przemyśle i medycynie, *Civil and Environmental Engineering*, 6, 161-179.
69. Goñi F.M., 2014, The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838, 1467-1476.
70. Gottfried E.L., 1967, Lipids of human leukocytes: relation to cell type, *Journal of Lipid Research*, 8, 321-327.
71. Graziani Y., Chayoth R., 1979, Regulation of cyclic AMP level and synthesis of DNA, RNA and protein by quercetin in Ehrlich ascites tumor cells, *Biochemical Pharmacology*, 28 (3), 397-403.
72. Grotewold E., The Science of Flavonoids. Springer Science & Business Media Inc., USA, 2006.
73. Grudziński W., Sagan J., Welc R., Luchowski R., Gruszecki W.I., 2016, Molecular organization, localization and orientation of antifungal antibiotic amphotericin B in a
single lipid bilayer, *Scientific Reports*, 6 , 32780,
http://dx.doi.org/10.1038/srep32780
74. Guimaraes J.F., Muzio B.P., Rosa C.M., Nascimento A.F., Sugizaki M.M., Fernandes A.A.H., Cicogna A.C., Padovani C.R., Okoshi M.P., Okoshi K., 2015, Rutin administration attenuates myocardial dysfunction in diabetic rats, *Cardiovascular Diabetology*, 14, 90, doi 10.1186/s12933-015-0255-7.
75. Guo, J.; Yue, T.; Yuan, Y.; Wang, Y., 2013, Chemometric classification of apple juices according to variety and geographical origin based on polyphenolic profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , *61*, 6949–6963.
76. Habtemarium S., Dagne E., 2010, Comparative antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of sigmoidin A and eriodictyol, *Planta Medica*, 76, 589–94.
77. Han, Y., 2007, Synergic Anticandidal Effect of Epigallocatechin-O-gallate Combined with Amphotericin B in a Murine Model of Disseminated Candidiasis and

Its Anticandidal Mechanism, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30, 1693–1696.

78. Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S., 1994, The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine*, 16, 845-850.
79. Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T., 1998, Mode of antibacterial action of retrochalcones from Glycyrrhiza inflata, *Phytochemistry*, 48, 125–129.
80. Hartwig U.A., Maxwell C.A., Joseph C.M., Phillips D.A., 1990, Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce nod genes in Rhizobium meliloti, *Plant Physiology*, 92, 116–122.
81. Hausen H., Poupartm G., W: P. Yeagle, The Structure of Biological Membranes, CRC Press, London, 3, 1992.
82. Havsteen B.H., 2002, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67-202.
83. Hazekamp A., Verpoorte R., Panthong A., 2001, Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant Clerodendrum petasites, *Journal of Ethnopharmacology*, 78 (1), 45-49.
84. Hąc-Wydro K., Dynarowicz-Łątka P., 2010, The relationship between the concentration of ganglioside GM1 and antitumor activity of edelfosine-the Langmuir monolayer study, *Colloid Surface B: Interfaces*, 81, 385-388.
85. Head B.P., Patel H.H., Insel P.A., 2014, Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function: Membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1838 (2), 532- 545.
86. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
87. Helewski K.J., Kowalczyk-Ziomek G.I., Konecki J., 2006, Apoptoza i martwica – dwie drogi do jednego celu, *Wiadomości lekarskie*, 59 (9-10), 679-684.
88. Hendrich A.B., Michalak K., 2003, Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells, *Current Drugs Targets*, 4 (1), 23-30.

89. Herrerias T., Oliveira A.A., Belem M.L., Oliveira B.H., Carnieri E.G.S., Cadena S.M.S.C., Noleto G.R., Martinez G.R., Oliveira M.B.M., Rocha M.E.M., 2010, Effects of natural flavones on membrane properties and citotoxicity of HeLa cells, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20 (3), 403-408.
90. Hianik T., 2006, Structure and physical properties of biomembranes and model membranes, *Acta Physica Slovaca*, 56 (6), 687-805.
91. Himeji M., Ohtsuki T., Fukazawa H., Tanaka M., Yazaki S., Ui S., Nishio K., Yamamoto H., Tasaka K., Mimura A., 2007, Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell, *Cancer Letters*, 245, 269-274.
92. Hollman P.C.H., Katan M.B., 1999, Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailbility, *Food and Chemical Toxicology*, 37 (9-10), 937-942.
93. Hordyjewska A., Pasternak K., 2005, Apoptotyczna śmierć komórki, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 14 (3), 545-554.
94. Hoque R., Alzaid F., Preedy V.R., Wiseman H., Sharp P.A., 2011, Effect of quercetin on non-haem iron transport in humanintestinal Caco-2 cells, *Proceedings of the Nutrition Society*, 0 (OCE6), E356.
95. Horáková L., 2011, Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function, *Interdisciplinary Toxicology*, 4(3), 114-124.
96. Hryniewicz-Jankowska A., Augoff K., Biernatowska A., Podkalicka J., Sikorski A.F., 2014, Membrane rafts as a novel target in cancer therapy, *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1845(2), 155–165.
97. Huang C.H., Li S., 1999, Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1422, 273–307.
98. Ikezoe T., Chen S.S., Heber D., Taguchi H., Koeffler H.P., 2001, Baicalin is a major component of PC-SPES which inhibits the proliferation of human cancer cells via apoptosis and cell cycle arrest, *Prostate*, 49, 285–292.
99. Ikigai H., Nakae T., Hara Y., Shimamura T., 1993, Bactericidal catechins damage the lipid bilayer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1147, 132–136.
100. Inbar M., Shinitzky M., 1974, Cholesterol as a Bioregulator in the Development and Inhibition of Leukemia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 4229-4231.

101. Iwashita K., Kobori M., Yamaki K., Tsushida T., 2000, Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 1813-1820.

102. Jacobs M., Rubery P.H., 1988, Naturally occurring auxin transport regulators, *Science*, 241, 346-349.

103. Jain, M.K., 1988, Introduction to Biological Membranes, 2nd edn, John Wiley & Sons, Inc., New York.

104. Jain M.K., Wu N.M., 1977, Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer, *Journal of Membrane Biology*, 34, 157-201.

105. Jandera P., Skeifikova V., Rehova L., Hajek T., Baldrianova L., Skopova G., Kellner V., Horna A., 2005, RP-HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beverages and plant extracts using a CoulArray detector, *Journal of Separation Science*, 28, 1005–1022.

106. Jankowska A., Skonieczna D., Rommerts F.F.C., Warchoł J.B., 1997, Investigations on apoptosis in Leydig cells cultured *in vitro*, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 33, 99–110.

107. Jasiński M., Mazurkiewicz E., Rodziewicz P., Figlerowicz M., 2009, Flawonoidy-budowa, właściwości i funkcja ze szczególnym uwzględnieniem roślin motylkowatych, *Biotechnologia*, 2(85), 81-89.

108. Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C., 2007, How rhizobial symbionts invade plants: The Sinorhizobium-Medicago model, *Nature Review Microbiology*, 5, 619–633.

109. Kampa R.P., Kicińska A., Jarmuszkiewicz W., Pasikowska-Piwko M., Dolegowska B., Dębowska R., Szewczyk A., Bednarczyk P., 2019, Naringenin as an opener of mitochondrial potassium channels in dermal fibroblasts, *Experimental Dermatology* 28 (5), 543- 550.

110. Karak P., 2019, Biological activities of flavonoids: an overview, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10 (4), 1567-1574.

111. Karłowicz-Bodalska K., Rudkowska E., Han-Marek M., 2006, Leki naturalne o działaniu ochraniającym ściany naczyń krwionośnych, *Postępy Fitoterapii*, 1, 47-60.

112. Karp G., Iwasa J., Marshall W., 2019, Karp's cell and molecular biology , 9th Edition. Wiley. ISBN: 978-1-119-59816-9

113. Kaul T.N., Middleton E.M.D., Ogra P.L., 1985, Antiviral effect of flavonoids on human viruses, *Journal of Medical Virology*, 15 (1), 71-79.

114. Kaur L., Kaur P., Khan M.U., 2013, Liposome as a drug carrier – a review, *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 3(1), 2231- 2781.

115. Kawiak J., Mirecka J., Olszewska M., Warchoł J., 1995, Podstawy cytofizjologii, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa. ISBN*: 83-01-11829-6.*

116. Kączkowski J, 1993, Biochemia roślin , PWN Warszawa, t. II, 11-15.

117. Khan M.S., Dosoky N.S., Williams J.D., 2013, Engineering lipid bilayer membranes for protein studies, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 21561-21597.

118. Khokhar S., Magnusdottir S.G., 2002, Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , *50*, 565–570.

119. Kilani-Jaziri S., Frachet V., Bhouri W., Ghedira K., Chekir-Ghedira L., Ronot X., 2012, Flavones inhibit the proliferation of human tumor cancer cell lines by inducing apoptosis, *Drug and Chemical Toxicology*, 35, 1–10.

120. Kim J. S., Kwon C. S., Son K. H., 2000, Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64, 2458-2461.

121. Kimata M., Shichijo M., Miura T., Serizawa I., Inagaki N., Nagai H., 2000, Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells**,** *Clinical & Experimental Allergy*, 30 (4), 501-508.

122. Kneer R., Poulev A., Olesinski A., Raskin I., 1999, Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from the roots of Lupinus luteus L, *Journal of Experimental Botany*, 50, 1553-1559.

123. Knobloch J., Suhendro D.K., Zieleniecki J.L., Shapter J.G., Köper Ingo., 2015, Membrane–drug interactions studied using model membrane systems, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 (6), 714-718.

124. Kobylińska A., Janas K.M., 2015, Prozdrowotna rola kwercetyny obecnej w diecie człowieka, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 69, 51-62.

125. Kojima K., 1993, Molecular aspects of the plasma membrane in tumor cells, *Nagoya Journal of Medical Science*, 56, 1 – 18.

126. Kong C.H., Zhao H., Xu X.H., Wang P., Gu Y., 2007, Activity and allelopathy of soil of flavone *O*-glycosides from rice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6007–6012.

127. Konig A., Schwartz G.K., Mohammad R.M., Al-Katib A., Gabrilove J.L., 1997, The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopirydol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines, *Blood*, 90, 4307-4312.

128. Kopacz M., Kuźniar A., 2003, Complexes of cadmium (II), mercury (II) and lead (II) with quercetin-5′-sulfonic acid (QSA), *Polish Journal of Chemistry* 77, 1777-1786.

129. Kosinova P., Berka K., Wykes M., Otyepka M., Trouilas P., 2012, Positioning of antioxidant quercetin and its metabolies in lipid bilayer membranes: implication for their lipid-peroxidation inhibition, *The Journal of Physical Chemistry*, 116, 1309-1318.

130. Koynova R., Caffrey M., 1998, Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376 (1), 91-145.

131. Kubica K., Langner M., Gabrielska J., 2003, The dependence of Fluorescein-PE fluorescence intensity on lipid bilayer state. Evaluating the interaction between the probe and lipid molecules, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 8, 943-954.

132. Kuhlmann C.R., Schaefer C.A., Kosok C., Abdallah Y., Walther S., Ludders D.W., Neumann T., Tillmanns H., Schafer C., Piper H.M., Erdogan A., 2005, Quercetin-induced induction of the NO/cGMP pathway depends on Ca2+-activated K+ channel-induced hyperpolarization-mediated Ca2+-entry into cultured human endothelial cells, *Planta Medica*, 71 (6), 520-524.

133. Kulkarni S.B., Dipali S.R., Betageri G.V., 1995, Protamine-induced Aggregation of Unilamellar Liposomes, *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 1 (8), 359-362.

134. Kumar D., Sharma D., Singh G., Singh M., Singh-Rathore M., 2012, Lipoidal Soft Hybrid Biocarriers of Supramolecular Construction for Drug Delivery,

International Scholarly Research Network Pharmaceutics, doi:10.5402/2012/474830.

135. Kuntz S., Wenzel S., Daniel H., 1999, Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer cell lines, *European Journal of Nutrition*, 38, 133-142.

136. Lamson D.W., Brignall M.S., 1999, Antioxidants in Cancer Therapy: their action and interaction with oncologic therapies, *Alternative Medicine Review*, 4 (5), 304-329.

137. Lasic D.D., Papahadjopoulos D., 1996, Liposomes and biopolymers in drug and gene delivery, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 1 (3), 392-400.

138. Lee H., Woo E.R., Lee D.G., 2018, Apigenin induces cell shrinkage in Candida albicans by membrane perturbation, *FEMS Yeast Research*, 18 (1), doi: 10.1093/femsyr/foy003.

139. Lee J.H., Regmi SC, Kim J.A., Cho M.H., Yun H., Lee C.S., Lee J., 2011, Apple flavonoid phloretin inhibits Escherichia coli O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats, *Infection and Immunity*, 79, 4819–4827.

140. Lee J.W., Kim Y.J., Choi Y.J., Woo H.D., Kim G.E., Ha T.K., Lee Y.H., Chung H.W., 2009, Cytotoxic Effects on HL-60 Cells of Myosin Light Chain Kinase Inhibitor ML-7 Alone and in Combination with Flavonoids, *Toxicological Research*, 25 (4), 181-188.

141. Lee T.J., Kim O.H., Kim Y.H., Lim J.H., Kim S., Park J.W., Kwon T.K., 2006, Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells, *Cancer Letters*, 240(2), 234–242.

142. Lee W.R., Shen S.C., Lin H.Y., Hou W.C., Yang L.L., Chen Y.C., 2002, Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cell accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease, *Biochemical Pharmacology*, 63, 225-236.

143. Lefort É.C., Blay J., 2013, Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers, *Molecular Nutrition & Food Research*, 57, 126 –144.

144. Lemańska K., Szymusiak H., Tyrakowska B., Zieliński R., Soffers A.E.M.F., Rietjens I.M.C.M., 2001, The influence of pH on antioxidant properties

and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones, *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 869-881.

145. Leśniak W., Porembska Z., Budowa i funkcja błony komórkowej. Polskie Towarzystwo biochemiczne, Warszawa, 1993, 1-28.

146. Lewis R.N.A.H, McElhaney R.N.,2005 The Mesomorphic Phase Behavior of Lipid Bilayers, [w:] The Structure of Biological Membranes, P. L. Yeagle (red), CRC Press.

147. Li E., Stupack D.G., Brown S.L., Klemke R., Schlaepfer D.D., Nemerow G.R., 2000, Association of p130CAS with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 14729–14735.

148. Li J., Ou-Lee T.M., Raba R., Amundson R., Last R.L., 1993, Arabidopsis flavonoids mutants are hypersensitive to UV-B irradiation, *Plant Cell*, 5 (2), 171-179.

149. Li N., Liu J.H., Zhang J., Yu B.Y., 2008, Comparative evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 3876–83.

150. Li Y.H., Tian X., 2012, Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms, *Sensors*, 12 (3), 2519-2538.

151. Li Y., Yao J., Han C., Yang J., Tabassum-Chaudry M., Wang S., Liu H., Yin Y., 2016, Quercetin, inflammation and immunity, *Nutrients*, 8(3), 167.

152. Li-Weber M., 2009, New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin, *Cancer Treatment Reviews*, 35 (1), 57-68.

153. Lian T., Ho R.J.Y., 2001, Trends and developments in liposome drug delivery systems, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (6), 667-680.

154. Litwińczuk-Mammadova A., Cieślik-Boczula K., Rospenk M., 2016, Budowa i funkcje układów białkowo-lipidowych, *Wiadomości Chemiczne*, 70 (11-12), 723-746.

155. Liu A.L., Liu B., Qin H.L., Lee S.M., Wang Y.T., Du G.H., 2008, Anti-influenza virus activities of flavonoids from the medicinal plant Elsholtzia rugulosa, *Planta Medica*, 74 (8), 847- 851.

156. Liu K.Z., Jia L., Kelsey J.S.M., Newland S.M., Mantsch A.C., 2001, Quantitative determination of apoptosis on leukemia cells by infrared spectroscopy, *Apoptosis*, 6, 269-278.

157. Liu W., Li L.P., Zhang J.D., Li Q., Shen H., Chen S.M., He L.J., Yan L., Xu G.T., An M.M., Jiang Y.Y., 2014, Synergistic Antifungal Effect of Glabridin and Fluconazole, *PLoS ONE*, 9, e103442.

158. Lyu S.Y., Rhim J.Y., Park W.B., 2005, Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*, *Archives of Pharmacal Research*, 28, 1293–1301.

159. Maciorkowska E., Ryszczuk E., Kaczmarski M., 2008, Czynniki wzbudzające i hamujące apoptozę w błonie śluzowej żołądka u dzieci zakażonych Helicobacter pylori, *Pediatria Współczesna Gastroenterologia, Hepatologia i Żywienie Dziecka*, 10 (3), 143-145

160. Majewska M., Czeczot H., 2009, Flawonoidy w profilaktyce i terapii, *Terapia i leki*, 65(5), 369-377.

161. Majumdar S. K., Valdellon J. A., Brown K. A., 2001, In vitro investigations on the toxicity and cell death induced by tamoxifen on two non-breast cancer cell types, *Journal of Biomedicine and Biotechnolology,* 1(3), 99–107.

162. Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A, 2012, Allelopathy as protectant, defense and growth stimulations in legume cereal mixed culture systems, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 40 (3), 161-186.

163. Makowska-Wąs J., Janeczko Z., 2004, Biodostępność polifenoli roślinnych, *Postępy Fitoterapii*, 3, 126-137.

164. Makrilia N., Kollias A., Manolopoulos L., Syrigos K., 2009, Cell adhesion molecules: Role and clinical significance in cancer, *Cancer Investigation*, 27, 1023–1037.

165. Malińska D., Kiersztan A., 2004, Flawonoidy – charakterystyka i znaczenie w terapii, *Postępy Biochemii*, 50, 182-196.

166. Małolepsza U., Urbanek H., 2000, Flawonoidy roślinne jako związki biochemicznie czynne, *Wiadomości Botaniczne*, 44(3/4), 27-37.

167. Marchand L.L., Murphy S.P., Hankin J.H., Wilkens L.R., Kolonel L.N., 2000, Intake of flavonoids and lung cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 92 (2), 154-160.

168. Margina D., Ilie M., Manda G., Neagoe I., Mocanu M., Ionescu D., Gradinaru D., Ganea C., 2012, Quercetin and epigallocatechin gallate effects on the cell membranes biophysical properties correlate with their antioxidant potential, *General Physiology and Biophysics*, 31, 47–55.

169. Martinez-Florez S., Gonzalez- Gallego J., Culebras J., Tuñón M.J., 2002, Flavonoids: properties and anti-oxidizing action, *Nutrictión Hospitalaria*, 17 (6), 271-278.

170. Marunaka Y., Marunaka R., Sun H., Yamamoto T., Kanamura N., Inui T., Taruno A., 2017, Actions of quercetin, a polyphenol, on the blood pressure, *Molecules*, 22 (2), 209, doi: 10.3390/molecules22020209.

171. Mastrobattista E., Koning G.A., Storm G., 1999, Immunoliposomes for targeting anti-cancer drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40, 103–127.

172. Matsui T., Korematsu S., Byun E.B., Nishizuka T., Ohshima S., Kanda T., 2009, Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K^+ channel activations, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 2246–2251.

173. Matsuo M., Sasaki N., Saga K., Kaneko T., 2005, Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells, *Biological and Pharmacological Bulletin*, 28 (2), 253-259.

174. Middleton E., Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C., 2000, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer., *Pharmacological Reviews*, 52, 673–751.

175. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A., 2014, Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment, *Molecules*, 19 (10), 16240–16265.

176. Mihoubi W., Sahli E., Gargouri A., Amiel C., 2017, FTIR-spectroscopy of whole cells for the monitoring of yeast apoptosis mediated by p53 over-expression and its suppression by *Nigella sativa* extracts, *PLOS One*, 12, 7: e0180680.

177. Miller K.B., Stuart D.A., Smith N.L., Lee C.Y., McHale N.L., Flanagan J.A., Ou, B., Hurst W.J., 2006, Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin

contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54,* 4062– 4068.

178. Mishra A.K., Mishra A., Kehri H.K., Sharma B., Pandey A.K. 2009, Inhibitory activity of Indian spice plant Cinnamomum zeylanicum extracts against Alternaria solani and Curvularia lunata, the pathogenic dematiaceous moulds, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8:9, doi: 10.1186/1476-0711-8-9

179. Mita P., De Luca A., Abbro L., Dini L., 2003, Ultrastructural analysis of apoptosis induced by apoptotic U937 cells conditioned medium, *Italian Journal of Zoology*, 70, 141-146.

180. Mitchell C.H., Carre D.A., McGlinn A.M., Stone R.A., Civan M.M., 1998, A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95, 7174-7178.

181. Mitek M, Gasik A., 2009, Polifenole w żywności. Wpływ na cechy organoleptyczne żywności, *Przemysł Spożywczy*, 5, 34-39.

182. Mizushina Y., Ishidoh T., Kamisuki S., Nakazawa S., Takemura M., Sugawara F., Yoshida H., Sakaguchi K., 2003, Flavonoid glycoside: a new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase α and a new carrier for inhibitor-affinity chromatography, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301 (2), 480-487.

183. Mondal M., Mesmin B., Mukherjee S., Maxfield F.R., 2009, Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells, *Molecular Biology of the Cell*, 20, 581-588.

184. Monteiro N., Martins A., Reis R.L., Neves N.M., 2014, Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine, *Journal of the Royal Society Interface*, 11, 20140459. http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0459.

185. Morales P., Haza A.I., 2012, Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells, *Journal of Applied Toxicology*, 32 (12), 986-993.

186. Moss G.P., Smith P.A., Tavernier D. 1995, Glossary of names of organic compounds and reactivity intermediates based on structure (IUPAC Redommendations 1995), *Pure and Applied Chemistry*, 67, 1307-1375.

187. Movileanu L., Neagoe I., Flonta M.L., 2000, Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers, *International Journal of Pharmaceutics*, 205 (1-2), 135-146.

188. Müller P., Herrmann A., 2002, Rapid transbilayer movement of spin-labeled steroids in human erythrocytes and in liposomes, *Biophysics Journal*, 82, 1418–1428.

189. Müller R.H., Hildebrand G.E., Jachowicz R., Kubis A.A., Klawe J., Bröker M., 2003, Technologia nowoczesnych postaci leków, Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.

190. Mutlu Altundağ E., Kasacı T., Yılmaz A.M., Karademir B., Koçtürk S., Taga Y., Yalçın A.S., 2016, Quercetin-induced cell death in human papillary thyroid cancer (B-CPAP) cells, *Journal of Thyroid Research*, doi: 10.1155/2016/9843675.

191. Nagao T., Abe F., Kinjo J., Okabe H., 2002, Antiproliferative Constituents in Plants 10. Flavones from the Leaves of Lantana Montevidensis Briq. and Consideration of Structure-Activity Relationship, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 875–879.

192. Nair H.K., Rao K.V., Aalinkeel R., Mahajan S., Chawda R., Schwartz S.A., 2004, Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1), 63–69.

193. Nair M.G., Safir G.R., Siqueira J.O.,1991, Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) Roots, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 434–439.

194. Nakajima T., Imanishi M., Yamamoto K., Cyong J.C., Hirai K., 2001, Inhibitory effect of baicalein, a flavonoid in Scutellaria Root, on eotaxin production by human dermal fibroblasts, *Planta Medica*, 67 (2), 132-135.

195. Nakazawa I., Iwaizumi M., 1989, A role of the cancer cell membrane fluidity in the cancer metastases: an ESR study, *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 157, 193–198.

196. Naoumkina M.A., Zhao Q., Gallego-Giraldo L., Dai X., Zhao P.X., Dixon R.A., 2010, Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways, *Molecular Plant Pathology*, 11, 829–846.

197. Nielsen I.L., Dragsted L.O., Ravn-Haren G., Freese R., Rasmussen S.E., 2003, Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2813–2820.

198. Niero EL., Rocha-Sales B., Lauand C., Cortez B.A., Medina de Souza M., Rezende-Teixeira P., Urabayashi M.S., Martens A.A., Neves J.H., Machado-Santelli G.M., 2014, The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1), 37.

199. Noreen Y., Serrano G., Perera P., Bohlin L., 1998, Flavan-3-ols isolated from some medical plants inhibitingCOX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis, *Planta Medica*, 64, 520-524.

200. Olszewska M., 2003, Flawonoidy i ich zastosowanie w lecznictwie, *Farmakopea Polska,*59(9), 391-401.

201. Ostrowska J., Skrzydlewska E., 2005, Aktywność biologiczna flawonoidów, *Postępy Fitoterapii*, 3-4, 71-79.

202. Oteiza P. I., Erlejman A. G., Verstraeten S. V., Keen C. L., Fraga C. G., 2005, Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface?, *Clinical & Developmental Immunology*, 12(1), 19–25.

203. Paolillo R., Carratelli C.R., Rizzo A., 2011, Effect of resveratrol and quercetin in experimental infection by Salmonella enterica serovar Typhimurium, *International Immunopharmacology*, 11(2), 149-156.

204. Park D.K., Lee Y.G., Park H.J., 2013, Extract of Rhus verniciflua bark suppresses 2,4-dinitrofluorobenzene-induced allergic contact dermatitis, Evidence-*Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013:879696. doi: 10.1155/2013/879696.

205. Pawlikowska-Pawlega B., Gruszecki W.I., Misiak L.E., Gawron A., 2003, The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes, *Biochemical Pharmacology*, 66, 605 – 612.

206. Pawlikowska-Pawlęga B., Gruszecki W.I., Misiak L., Paduch R., Piersiak T., Zarzyka B., Pawelec J., Gawron A., 2007, Modyfication of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1768, 2195-2204.

207. Pawlikowska-Pawlęga B., Król E., Trębacz K., Gawron A., 2009, Genistein and changes of resting and actions potentials in *Conocephalum conicum, Journal of Plant Physiology*, 166, 712-719.

208. Pawlikowska-Pawlega B., Misiak L.E., Zarzyka B., Paduch R., Gawron A., Gruszecki W.I., 2012, Localization and interaction of genistein with model membranes formed with dipalmitoylophosphatidylcholine (DPPC), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818, 1785-1793.

209. Pawlikowska-Pawlega B., Misiak L.E., Zarzyka B., Paduch R., Gawron A., Gruszecki W.I., 2013, FTIR, 1H NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828, 518-527.

210. Pawlikowska-Pawlęga B., Dziubińska H., Król E., Trębacz K., Jarosz-Wilkołazka A., Paduch R., Gawron A., Gruszecki W. J., 2014, Characteristic of quercetin interactions with liposomal and vacuolar membranes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838, 254-256.

211. Peetla C., Vijayaraghavalu S., Labhasetwar V., 2013, Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (13-14), 1686-1698.

212. Petelska B.S., Figaszewski Z., Lewandowski W., 2001, Mechanisms of transport across cell membranes of complexes contained in antitumour drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 222, 169–182.

213. Pietta P.G., 2000, Flavonoids as antioxidants, *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.

214. Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer T., Jerala R., 2003, Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, 530–536.

215. Plochmann K., Korte G., Koutsilieri E., Richling E., Riederer P., Rethwilm A., Schreier P., Scheller C., 2007, Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460 (1), 1-9.

216. Ponce M.A., Scervino J.M., Erra-Balsells R., Ocampo J.A., Godeas A.M., 2004, Flavonoids from shoots and roots of Trifolium repens (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices, *Phytochemistry*, 65, 1925–1930.

217. Popova A.V., Hincha D.K., 2013, Interactions of the amphiphiles arbutin and tryptophan with phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers in dry state, *BMC Biophysics,* 6, 1-10.

218. Popova A.V., Hincha D.K., 2016, Effects of flavonol glycosides on liposome stability during freezing and drying, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858, 3050-3060.

219. Priyadarsini V.R., Murugan S.R., Maitreyi S., Ramalingam K., Karunagaran D., Nagini S., 2010, The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-κB inhibition, *European Journal of Pharmacology,* 649, 84–91.

220. Procházková D., Boušová I., Wilhelmová N., 2011, Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.

221. Przestalski S. Biofizyka błon. *Fizjologia i farmakologia błony komórkowej*, Ossolineum, Wrocław 1989. 23-41.

222. Ranganathan S., Halagowder D., Sivasithambaram N.D., 2015, Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells., *PLoS One*, 10(10):e0141370. doi: 10.1371/journal.pone.0141370.

223. Ravishankar D., Rajora A.K., Greco F., Osborn H.M.I., 2013, Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45 (12), 2821-2831.

224. Razak N.A., Abu N., Ho W.Y., Zamberi N.R., Tan S.W., Alitheen N.B., Long K., Yeap S.K., 2019, Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis, *Scientific Reports*, 9, 1514.

225. Reddy P.M., Rendón-Anaya M., de los Dolores Soto del Rio M., Khandual S., 2007, Flavonoids as signaling molecules and regulators of root nodule development, *Dynamic Soil Dynamic Plant*, 1, 83–94.

226. Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L., 2003, Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews* , 23(4), 519-534.

227. Revuelta M.P., Cantabrana B., Hidalgo A., 1997, Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCL2, *General Pharmacology*, 29, 847-857.

228. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.

229. Richter M, Ebermann R, Marian B., 1999, Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling, *Nutrition and Cancer*, 34(1), 88–99.

230. Riedl S., Zweytick D., Lohner K., 2011, Membrane-active host defense peptides – Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs, *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 766–781.

231. Rienks J., Barbaresko J., Nothlings U., 2017, Association of isoflavone biomarkers with risk of chronic disease and mortality: A systematic review and meta-analysis of observational studies, *Nutrition Review, 75*, 616–641.

232. Rigas B., Wong P.T.T., 1992, Human colon adenocarcinoma cell lines display infrared spectroscopic features of malignant colon tissues, *Cancer Research*, 52, 84-88.

233. Rodriguez-Garcia C., Sanchez-Quesada C., Gaforio J.J., 2019, Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies, *Antioxidant*, 8 (37), doi:10.3390/antiox8050137.

234. Rong Y., Yang E.B., Zhang K., Mack P., 2000, Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression, *Anticancer Research*, 20, 4339- 4345.

235. Ryan K.G., Swinny E.E., Markham K.R., Winefield C., 2002, Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant Petunia leaves, *Phytochemistry*, 59, 23–32.

236. Rybczyńska M., Spitaler M., Knebel N.G., Boeck G., Grunicke H., Hofmann J., 2001, Effects of miltefosine on various biochemical parameters in a panel of tumor cell lines with different sensitivities, *Biochemical Pharmacology*, 62, 765–772.

237. Sadowska A., Skarżyńska E., Rakowska R., Batogowska J., Waszkiewicz-Robak B., 2014, Substancje bioaktywne w surowcach pochodzenia roślinnego i roślinach zielarskich, *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2, 131-135.

238. Sak K., 2014, Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types, *Pharmacognosy Review*, 8 (16), 122-146.

239. Sakagami H., Jiang Y., Kusama K., Atsumi T., Ueha T., Toguchi M., Iwakura I., Satoh K., Fukai T., Nomura T., 2000, Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid-substituted flavonoids in human oral tumor cell line, *Anticancer Research*, 20, 271-277.

240. Samand A., Sultana Y., Aqil M., 2007, Liposomal drug delivery systems: an update review, *Current Drug Delivery*, 4(4), 297-305.

241. Samaszko-Fiertek J., Roguszczak P., Dmochowska B., Ślusarz R., Madaj J., 2016, Rutyna: budowa, właściwości, *Wiadomości Chemiczne*, 70(7-8), 435-453.

242. Schliemann W., Ammer C., Strack D., 2008, Metabolite profiling of mycorrhizal roots of Medicago truncatula, *Phytochemistry*, 69, 112–146.

243. Scholz E.P., Zitron E., Katus H.A., Karle C.A., 2010, Cardiovascular Ion Channels as a Molecular Target of Flavonoids, *Cardiovascular Therapeutics*, 28 (4), e46-e52.

244. Selkirk J.K., Elwood J.C., Morris H.P., 1971, Study on the Proposed Role of Phospholipid in Tumor Cell Membrane, *Cancer Research*, 31, 27-31.

245. Selvaraj S., Krishnaswamy S., Devashya V., Sethuraman S., Krishnan U.M., 2015, Influence of membrane lipid composition on flavonoid-membrane interactions: Implications on their biological activity, *Progress in Lipid Research*, 58, 1-13.

246. Selway J.W., 1986, Antiviral activity of flavones and flavans, *Progress in Clinical and Biological Research*, 213, 521–536.

247. Sghaier M.B., Harizi H., Louhichi T., Krifa M., Ghedira K., Chekir-Ghedira L., 2011, Anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of leaf extracts and sesquiterpene from Teucrium ramosissimum (Lamiaceae), *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(4), 656–662.

248. Sharma A., Sharma U.S., 1997, Liposomes in drug delivery: Progress and limitations, *International Journal of Pharmaceutics*, 154 (2), 123-140.

249. Silver-Marinkovic. 2016, Liposomes as drug delivery systems in dermal and transdermal drug delivery. W: Dragicevic N., Maibach H.I. (red.) Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Nanocarriers. Doi 10.1007/978-3-662-47862-2_2.

250. Singh R.P., Agarwal R., 2006, Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells, *Current Drug Target*, 7 (3), 345-354.

251. Sinha R., Gadhwal M.K., Joshi U.J., Srivastava S., Govil G., 2012, Modifying effect of quercetin on model biomembranes: studied by molecular dynamic stimulation, DSC and NMR, *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4(1), 70-79.

252. Sipai Altaf Bhai M., Vandana Y., Mamatha Y., Prasanth V.V., 2012, Liposomes: an overview, *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 1 (1), 13-21.

253. Slagel D. E., Dittmer J. C, Wilson C. B., 1967, Lipid composition of human glial tumour andadjacent brain, *Journal of Neurochemistry*, 14, 789–798.

254. Sok M., Šentjurc M., Schara M., 1999, Membrane fluidity characteristics of human lung cancer, *Cancer Letters*, 139, 215-220.

255. Solomon K. R. Freeman M. R., 2008, Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk?, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19 (4), 113-121.

256. Song J.M., Lee K.H., Seong B.L., 2005, Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus, *Antiviral Research*, 68, 66-74.

257. Sonnino S., Mauri L., Chigorno V., Prinetti A., 2007, Gangliosides as components of lipid membrane domains, *Glycobiology*, 17, 1–13.

258. Stafford J.H., Thorpe P.E., 2011, Increased exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of tumor vascular endothelium, *Neoplasia*, 13 (4), 299-308.

259. Startek J.B., Boonen B., Talavera K., Meseguer V., 2019, TRP channels as sensors of chemically-induced changes in cell membrane mechanical properties, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 371; doi:10.3390/ijms20020371

260. Steadman K.J., Burgoon M.S., Lewis B.A., Edwardson S.E., Obendorf R.L., 2001, Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*, 1094–1100.

261. Stillwel W., 2013, Biological Membranes, Elsevier Science, ISBN 13: 9780444521538.

262. Strugała P., Tronina T., Huszcza E., Gabrielska J., 2017, Bioactivity In Vitro of Quercetin Glycoside Obtained in *Beauveria bassiana* Culture and Its Interaction with Liposome Membranes, *Molecules*, 22 (9), 1520.

263. Stryer L., 2003, Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, ISBN 83-01-13978-1.

264. Subczyński W.K., Wiśniewska A., 2000, Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions, *Acta Biochimica Polonica*, 47 (3), 613-625.

265. Sukardiman-Darwanto A., Tanjung M., Darmadi M.O., 2000, Cytotoxic mechanism of flavonoids from Temu Kunci (Kaempferia pandurata) in cell culture of human mammary carcinoma, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 23, 185-190.

266. Surewicz, W. K., Mantsch H.H., 1988, New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra, *Biochimica et Biophysica Acta*, 952, 115–130.

267. Syam S., Abdelwahab S.I., Al-Mamary M.A., Mohan S., 2012, Synthesis of chalcones with anticancer activities, *Molecules*, 17, 6179-6195.

268. Swaminathan J., Ehrhardt C, 2011, Liposomes for pulmonary drug delivery. W: Smyth H.D.C., Hickey A.J.(red.) Pulmonary drug delivery, Advances in Delivery Sciences and Technology Springer, ISBN 978-1-4419-9745-6.

269. Tachibana H., 2011, Green tea polyphenol sensing, *Proceeding of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*, 87, 66-80.

270. Talib W.H., Abu Zarga M.H., Mahasneh A.M., 2012, Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*, *Molecules*, 17, 3291–3303.

271. Tamba Y., Ohba S., Kubota M., Yoshioka H., Yoshioka H., Yamazaki M., 2007, Single GUV Method Reveals Interaction of Tea Catechin (−)-Epigallocatechin Gallate with Lipid Membranes, *Biophysical Journal*, 92 (9), 3178-3194.

272. Tamm L.K., Tatulian S.A., 1997, Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers, *Quartely Reviews of Biophysics*, 30(4), 365-429.

273. Tarahovsky Y.S., Kim Y.A., Yagolnik E.A., Muzafarov E.N., 2014, Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838, 1235-1246.

274. Tardieu A., Luzzati V., Reman F.C., 1973, Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases, *Journal of Molecular Biology*, 75(4), 711-733.

275. Tarko T., Semik D., Duda-Chodak A., Satora P., Sroka P., 2016, Przemiany związków polifenolowych w symulowanym przewodzie pokarmowym człowieka, *Żywność: Nauka- Technologia- Jakość*, 2(105), 132-144.

276. Tekpli X., Holme J.A., Sergent O., Lagadic-Gossmanm D., 2013, Role for membrane remodeling in cell death: implication for health and disease, *Toxicology*, 304, 141–57.

277. Tomas-Barberan F.A., Cienfuegos-Jovellanos E., Marin A., Muguerza B., Gil-Izquierdo A., Cerda B., Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Ibarra A., Pasamar M.A., Ramon D., Espin J.C., 2007, A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,55*, 3926–3935.

278. Totoń E., Rybczyńska M., 2007, The characteristics of focal adhesion kinase (FAK) and its role in carcinogenesis, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 61, 303-309.

279. Tresset G., 2009, The multiple faces of self-assembled lipidic systems, *PMC Biophysics*, 2 (1), 3.

280. Tsai S.M., Phillips D.A., 1991, Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic glomus spores *in vitro*, *Applied and Environmental Microbiology*, 57,1485–1488.

281. Tsan M.F., Goa B, 2009, Heat shock proteins and immune system, *Journal of Leukocyte Biology*, 85 (6), 905-910.

282. Tsuchiya H., 1999, Effects of green tea catechins on membrane fluidity, *Pharmacology*. 59, 34–44.

283. Tsuchiya H., 2001, Stereospecificity in membrane effects of catechins, *Chemico- Biological Interactions*, 134, 41 – 54.

284. Tsuchiya H., 2010, Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity, *Food Chemistry*, 120, 1089-1096.

285. Tsuchiya H., 2011, Effects of red wine flavonoid components on biomembranes and cell proliferation, *International Journal of Wine Research*, 3, 9–17.

286. Tsuchiya H., Nagayama M., Tanaka T., Furusawa M., Kashimata M., Takeuchi H., 2002, Membrane rigidifying effects of anti-cancer dietary factors, *BioFactors*, 16, 45–56.

287. Tsuchiya H., Nagayama M., 2008, Garlic allyl derivatives interact with membrane lipids to modify the membrane fluidity, *Journal of Biomedical Science*, 15, 653-660.

288. Tsyrlov I.B., Mikhailenko V.M., Gelboin H.V., 1994, Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1AP450s to different flavonoids, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205, 325-335.

289. Ulanowska K., Tkaczyk A., Konopa G., Węgrzyn G., 2006, Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains, *Archives of Microbiology*, 184 (5), 271-278.

290. Vahed S.Z., Salehi R., Davaran S., Sharifi S., 2017, Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells, *Material Science and Engineering: C*, 71, 1327-1341.

291. Van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W., 2008, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nature*, 9, 113-124.

292. Vance D.E., Vance J.E., 2008, Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes,5 th Edition, Elsevier. ISBN: 9780080559889

293. Varner J. A., Cheresh D. A., 1996, Integrins and cancer, *Current Opinion in Cell Biol*ogy, 8(5), 724-730.

294. Verstraeten S.V., Nogueira L.V., Schreier S., Oteiza P.I., 1997, Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: Role in lipid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 338, 121 – 127.

295. Verstraeten S.V., Oteiza P.I., 2000, Effects of Al3þand related metals on membrane phase state and hydration: Correlation with lipidoxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 375, 340 – 346.

296. Viladevall L., Serrano R., Ruiz A., Domenech G., Giraldo J., Barcelo A., Arino J., 2004, Characterization of the Calcium-mediated Response to Alkaline Stress in Saccharomyces cerevisiae, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (42), 43614-43624.

297. Wallace C.H.R., Baczkó I., Jones L., Fercho M., Light P.E., 2006, Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols, *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 149 (6), 657- 665.

298. Wang G., Zhang J., Liu L., Sharma S., Dong Q., 2012, Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl, *PLoS ONE*, 7(12), e51764.

299. Wang I.K., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K., 1999, Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells, *European Journal of Cancer*, 35, 1517-1525.

300. Wang S., Tian Q., An F., 2016, Growth inhibition and apoptotic effects of total flavonoids from Trollius chinensis on human breast cancer MCF-7 cells, *Oncology Letters*, 12, 1705-1710.

301. Warren J.M., Bossman J.H., Mattinson S.D., Fellman J.K., Edwards G.E., Robberecht R., 2002, Alteration of foliar flavonoid composition induced by enhanced UV-B radiation in *Pinus ponderosa, Quercus rubra, Pseudotsuga menziesii* and *Populus trichocarpa*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, 125-133.

302. Watson H., 2015, Biological membranes, *Essays in Biochemistry*, 59, 43-69.

303. Webster G., Jain V., Davey M.R., Gough C., Vasse J., Dénarié J., Coking E.C., 1998, The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by Azorhizobium caulinodans, *Plant, Cell & Environment,* 21, 373–383.

304. Wei H., Tye L., Bresnick E., Birt D.F., 1990, Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice, *Cancer Research*, 50 (3), 499- 502.

305. Wenzel U., Kuntz S., Brendel M.D., Daniel H., 2000, Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells, *Cancer Research*, 60, 3823- 3831.

306. Wesołowska O., Hendrich A.B., Łania-Pietrzak B., Wiśniewski J., Molnar J., Ocsovszki I., Michalak K., 2009, Perturbation of the lipid phase of a membrane is not involved in the modulation of MRP1transport activity by flavonoids, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 14, 199-221.

307. Wiczkowski W., Piskuła M.K., 2004, Food flavonoids, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 54, 101-114.

308. Wieczorek M., Sobiak S., Meissner R.K., 2006, Rozwój badań nad wykorzystaniem substancji pochodzenia roślinnego w terapii nowotworów, *Nowiny Lekarskie,* 75 (4), 407- 413.

309. Winter J., Moore L. H., Dowell V. R., Jr. &. Bokkenheuser,V. D., 1989, C-Ring cleavage of flavonoids by human intestinalbacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1203-1208.

310. Wood W.G., Igbavboa U., Müller W.E., Eckert G.P., 2011, Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes, Journal of Neurochemistry, 116, 684-689.

311. Wójtowicz K., Pawlikowska-Pawlęga B., Gawron A., Gruszecki W.I., 1996, Modifying effect of quercetin on the lipid membrane, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 34, 49-50.

312. Wu T., Zang X., He M., Pan S., Xu X., 2013, Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8185–8190.

313. Wuyts N., Swennen R., de Waele D., 2006, Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes Radopholus similis, Pratylenchus penetrans and Meloidogyne incognita, *Nematology*, 8, 89–101.

314. Yang C.Y., Cai S. J., Liu H., Pidgeon C., 1997, Immobilized artificial membranes–screen for drug membrane interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 29–256.

315. Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S., 2004, Flavonoids in food and their health benefits, *Plant Foods for Human Nutrition*, 59 (3), 113-122.

316. Yin F., Giuliano A.E., Van Herle A.J., 1999, Signal pathway involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO), *Anticancer Research*, 19, 4297-4303.

317. Yoshida M., Sakai T., Hosokawa N., Marui N., Matsumoto K., Fujioka A., Nishino H., Aoike A., 1990, The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells, *FEBS Letters*, 260(1), 10–13.

318. Yura Y., Yoshida H., Sato M., 1993, Inhibition of herpes simplex virus replication by genistein, an inhibitor of protein-tyrosine kinase, *Archives of Virology*, 132, 451–461.

319. Zalba S., ten Hagen T.LM., 2017, Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy, *Cancer Treatment Reviews*, 52, 48-57.

320. Zhang N., Yang Z., Yuan Y., Li F., Liu Y., Ma Z., Liao H., Bian Z., Zhang Y., Zhou H., Deng W., Zhou M., Tang Q., 2015, Naringenin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(6), 2206-2212.

321. Zhang W., Xiaoxial X. U., Chen H., Zhang J., Zhang X., Luo R., Fang F., 2007, Effect of Quercetin on Breeding and Apoptosis of Cervical Cancer 85 HeLa Cell and on Growth of Transplanted Tumor in Nude Mice, *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 12 (3), 569-576.

322. Zheng S.Y., Li Y., Jiang D., Zhao J., Ge J.F., 2012, Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer cell line A-549, *Molecular Medicine Reports*, 5(3), 822–826.

323. Zheng Y., Morris A., Sunkara M., Layne J., Toborek M., Hennig B., 2012, Epigallocatechin-gallate stimulates NF-E2-related factor and heme oxygenase-1 via caveolin-1 displacement, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 163-168.

324. Zhong J., Dai L.C., 2012, Targeting Liposomal Nanomedicine to Cancer Therapy, *Technology in Cancer Research and Treatment*, 11(5), 475-481.

325. Zhu Q.Y., Huang Y., Tsang D., Chen Z.Y., 1999, Regeneration of alpha-tocoferol in human low-density lipoprotein by green tea catechin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2020-2025.

326. Zhu O.Y., Huang Y., Chen Z.Y., 2000, Interaction between flavonoids and α-tocopherol in human low density lipoprotein, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 14-21.

327. Zhuang L., Lin J., Lu M.L., Solomon K.R., Freeman M.R., 2002, Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells, *Cancer Research*, 62(8), 2227–31.

328. Zwaal R.F.A., Comfurius P., Bevers E.M., 2005, Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells, *Cellular and Molecular Life Science*, 62 (9), 971-988.

329. Żebrowski M.R., Kierus A., Żmijewska A., 2001, Dwa mechanizmy śmierci komórek w strefie zawału serca- martwica i apoptoza, *Forum Kardiologów*, 6(4), 165-167.

330. Żuchowski J., Pecio Ł., Stochmal A., 2014, Novel flavonol glycosides from the aerial parts of lentil (Lens culinaris), *Molecules*, 19, 18152–18178

VIII. Spis rycin

IX. Spis tabel

X. Aneks – życiorys naukowy

Imię i nazwisko	Justyna Helena Kapral-Piotrowska
Email	justyna.kapral-piotrowska@poczta.umcs.lublin.pl

WYKSZTAŁCENIE

2009 Absolwentka Zespołu Szkół Licealnych im. Bolesława Chrobrego w Leżajsku

2012 Tytuł zawodowy **licencjata** na kierunku **Biologia**, specjalność **Biochemia**, Tytuł pracy licencjackiej: *Występowanie i funkcjonowanie β-glukanaz w organizmach grzybów*;

promotor – dr Monika Osińska-Jaroszuk

2014 Tytuł zawodowy **magistra** na kierunku **Biologia**, specjalność **Biochemia**, Tytuł pracy magisterskiej: *Izolacja i wstępna charakterystyka polisacharydów zewnątrzkomórkowych pozyskanych ze szczepów grzybowych Abortiporus biennis i Lentinus cyathiformis;*

promotor – prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkołazka

od 2014 Uczestniczka studiów III stopnia na kierunku **Biologia**

UDZIAŁ W GRANTACH I PROJEKTACH BADAWCZYCH

2015-2018 Członek zespołu realizującego grant " Analiza wybranych właściwości fizykochemicznych, biologicznych i farmakologicznych materiałów biomedycznych zmodyfikowanych syntetycznym inhibitorem proteaz serynowych (nr 2014/15/N/NZ7/04092) finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) w ramach projektu kierowanego przez dr Katarzynę Szałapatę.

2016 Kierownik grantu zespołowego dla młodych pracowników i doktorantów pt. *„Wpływ związków pochodzenia naturalnego na błony sztuczne i naturalne z uwzględnieniem skutków ich działania na komórki”* (nr PSP: BS-M-11-010-16-1-02) przyznawany przez Komisję ds. Badań Naukowych Młodych Pracowników Naukowych i Doktorantów.

2017 Kierownik grantu indywidualnego dla młodych pracowników i doktorantów pt. *„ Interakcje lenzozydu Aβ z błonami sztucznymi i naturalnymi z uwzględnieniem skutków jego działania na komórki”* (nr PSP: BS-M-11-010-17-1-08) przyznawany przez Komisję ds. Badań Naukowych Młodych Pracowników Naukowych i Doktorantów.

2019 Kierownik grantu indywidualnego dla młodych pracowników i doktorantów pt. „*Wpływ lenzozydu Aβ na właściwości modelowych błon komórkowych*” (nr PSP: BS-B-11-001-01-M) przyznawany przez Komisję ds. Badań Naukowych Młodych Pracowników Naukowych i Doktorantów.

2019 Członek zespołu realizującego projekt pt. „*Enzymatyczna synteza związków o aktywności antymikrobiologicznej i antyoksydacyjnej w dwuskładnikowych układach transformacyjnych*”, SONATA, NCN, umowa nr UMO-2016/21/D/NZ9/02460 kierowanego przez dr Jolantę Polak.

WYKAZ PUBLIKACJI RECENZOWANYCH W CZASOPISMACH NAUKOWYCH WYRÓŻNIONYCH PRZEZ JOURNAL CITATION REPORTS (JCR)

1. Pawlikowska-Pawlęga B., **Kapral-Piotrowska J.,** Gawron A., Stochmal A., Żuchowski J., Pecio Ł., Luchowski R., Grudziński W., Gruszecki W.I. 2018. Interaction of quercetin derivative – lensoside A <beta> with liposomal membranes. BBA – Biomembranes 1860: 292-299 **(IF =3,498, Pkt$_{MNiSW}$=35)**
2. Grąz M., Jarosz-Wilkołazka A., Pawlikowska-Pawlęga B., Janusz G., **Kapral-Piotrowska J.,** Ruminowicz-Stefaniuk M., Skrzypek T., Zięba E. 2019. Oxylate oxidase from *Abortiporus biennis* - protein localisation and gene sequence analysis. International Journal of Biological Macromolecules 148: 1307-1315 **(IF =4,784, Pkt$_{MNiSW}$=100)**
3. Szałapata K., Osińska-Jaroszuk M., **Kapral-Piotrowska J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Łopucki R., Mroczak R., Jarosz-Wilkołazka A. 2020. Serine protease inhibitors - new molecules for modyfication of polymeric biomaterials. Biomolecules 10 (1), 83; doi:10.3390/biom10010082 (**IF =4,082, Pkt$_{MNiSW}$=100)**

4. Polak J., Wlizło K., Pogni R., Petricci E., Grąz M., Szałapata K., Osińska-Jaroszuk M., **Kapral-Piotrowska J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Jarosz-Wilkołazka A. 2020. Strucutre and Bioactive Properties of Novel Textile Dyes Synthesised by Fungal Laccase. Internatinal Journal of Molecular Sciences 21, 2052; doi:10.3390/ijms21062052 (**IF =4,556, Pkt$_{MNiSW}$=100)**

WYKAZ MONOGRAFII I ROZDZIAŁÓW W MONOGRAFIACH

1. Bilska S., Wawruszak A., Odrzywolski A., Dudek A., **Kapral J**. 2015. Czynniki prognostyczne i terapia przewlekłej białaczki limfocytowej (PBL). Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-942083-1-8.Poznań. str. 7-14. (Pkt$_{MNiSW}$=5)
2. Bilska S., Dudek A., **Kapral J**. Wawruszak A., Odrzywolski A. 2015. Chemoprewencyjne działanie hesperydyny, naryngeniny, tangeretyny i nobiletyny. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-942083-1-8. Poznań. Str. 21-24. (Pkt$_{MNiSW}$=5)
3. **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga B. 2016. Przeciwnowotworowe działanie apigeniny. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65362-25-4. Poznań. str. 34-40. (Pkt$_{MNiSW}$=5)
4. **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga B. 2016. Interakcje apigeniny z błonami. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65362-25-4. Poznań. str. 41-46. (Pkt$_{MNiSW}$=5)
5. **Kapral J**. 2016. Synergistyczne działanie kurkuminy z chemoterapeutykami oraz związkami fenolowymi w leczeniu nowotworów. Wydawnictwo Młodzi Naukowcy. ISBN 978-83-65362-61-2, Poznań. str. 73-79(Pkt$_{MNiSW}$=5)

WYKAZ KOMUNIKATÓW ZJAZDOWYCH

1. **Kapral-Piotrowska J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Barzycka A., Koselski M., Trębacz K., Paduch R., Żuchowski J., Chudzik B., Włodarczyk M., Gruszecki W.I. Interakcje lenzozydu Aβ z komórkami fibroblastów skóry człowieka linii HSF. XXVI Lubelskie Warsztaty Biofizyczne 29-30.05.2019.Kazimierz Dolny nad Wisłą.

2. **Kapral-Piotrowska J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Jakubowicz-Gil J., Sławińska-Brych A., Zdzisińska B., Paduch R., Grudziński W., Luchowski R., Gruszecki W.I. The influence of querectin on human negroid cervix carcinoma (HeLa) cells challnged by hydrogen peroxide.53 rd Sympodium of Polish Society for

Histochemistry and Cytochemistry. From ultrastructure to in vivo imging: progess in microscopical techniques, 15-18. 09.2019. Gdańsk.

3. Szałapata K., Pięt M., **Kapral J**., Paduch R., Pawlikowska-Pawlęga B., Osińska-Jaroszuk M., Jarosz-Wilkołazka A. Cytotoxic potential analysis of biomaterials modified with proteolytic enzyme inhibitors. Abstracts of the 3rd Congress of Polish Bioscience BIO2018 „Through interdisciplinary approach into new solutions", 18-21 .09. 2018. Gdańsk .

4. Czemierska M., Kapral J., Szcześ A., Pawlikowska-Pawlęga B., Jarosz-Wilkołazka A.2018 : Characterisation of a novel bioflocculant produced by Rhodococcus opacus strain. Abstracts of the 3rd Congress of Polish Bioscience BIO2018 „Through interdisciplinary approach into new solutions" 18-21.09.2018. Gdańsk.

5. Szałapata K., **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga, Osińska-Jaroszuk M., Jarosz-Wilkołazka A. Biomaterials modyfied with synthetic AEBSF inhibitor with properties inhibiting the growth and biofilm formation by Staphylococcus aureus strain. FEBS Congres, 7-12.07.2018. Praga.

6. Pawlikowska- Pawlęga B., **Kapral J**., Paduch R., Sławińska Brych A., Zdzisińska B., Zarzyka B., Chudzik B., Gruszecki W.I. Interakcje lenzozydu Aβ z ludzkimi komórkami raka krtani linii Hep-2. Materiały zjazdowe 52 Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików. Immunohistochemia i biologia molekularna w morfologii, 13-16.09.2018. Białystok.

7. Pawlikowska-Pawlęga B., **Kapral J**., Paduch, Zarzyka B., Wawrzyniak A., Łuszczewska-Sierakowska I., Gawron A., Gruszecki W. I. Interakcje kwercetyny z białkami i lipidami błon komórek raka szyjki macicy (HeLa).Materiały Zjazdowe 51 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików**.** 12-14. 09. 2017. Warszawa.

8. **Kapral J**. 2017: Fotoprotekcyjne działanie flawonoidów. Książka abstraktów IV Forum Młodych Naukowców, str. 83, 27 maja, Lublin

9. Czemierska M., **Kapral J**., Szcześ A., Pawlikowska-Pawlęga B., Jarosz-Wilkołazka A., 2017: Flocculating activity of Rhodococcus opacus FCL-1069. 31th Conference of the European Colloid &Interface Society. 3-8.08.2017. Madryt.

10. **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Paduch R., Żuchowski J., Stochmal A., Gawron A., Gruszecki W. I. Interaction of lensoside Aβ with human cervix

carcinoma cells (HeLa). 5th International Conference And Workshop 'Plant – The Source Of Research Material'", 21-23.06. 2017. Lublin.

11. **Kapral J.,** Pawlikowska-Pawlęga B., Paduch R., Stochmal A., Żuchowski J., Pecio Ł., Luchowski R., Grudziński W., Gruszecki W.I. Wpływ lenzozydu Aβ na błony sztuczne i naturalne z uwzględnieniem skutków jego działania na komórki. Spotkanie Lubelskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, 7.11.2016. Lublin.
12. **Kapral J.,** Pawlikowska-Pawlęga B., Paduch R., Stochmal A., Żuchowski J., Pecio Ł., Luchowski R., Grudziński W., Gruszecki W.I. Wpływ lenzozydu Aβ na liposomy DPPC oraz komórki raka szyjki macicy (HeLa).50 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików. 5-8.09. 2016. Wojanów.
13. **Kapral J.,** Pawlikowska-Pawlęga B., Gawron A., Paduch R., Wawrzyniak A., Łuszczewska-Sierakowska I., Gruszecki W.I. Interakcje genisteiny z komórkami raka szyjki macicyczłowieka (HeLa). XXIII Lubelskie Warsztaty Biofizyczne 24-25.05.2016. Kazimierz Dolny nad Wisłą.
14. Szałapata K., **Kapral J.,** Pawlikowska-Pawlęga B., Czemierska M., Wlazło K., Osińska-Jaroszuk M., Jarosz-Wilkołazka A. Materiały biomedyczne modyfikowane inhibitorami enzymów proteolitycznych. VII Lubelskie Sympozjum Doktorantów Nauk Farmaceutycznych wraz z Otwartym Seminarium Nauk o Życiu. 19.04.2016. Lublin.
15. **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga B. Wpływ kwercetyny na zjawisko oporności wielolekowej (MDR). Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2016. 15.04.2016. Lublin.
16. **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Paduch R., Gruszecki W.I. Wrażliwość komórek linii HeLa na działanie kwercetyny. V Interdyscyplinarne Seminarium Naukowe Molekularne Mechanizmy Powstawania Chorób Nowotworowych. 1.04.2016. Lublin.
17. **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Paduch R., Gruszecki W.I., Gawron A. Wrażliwość komórek linii Hep-2, HeLa i HT-29 na działanie apigeniny. Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2015. 27.11.2015. Lublin.
18. **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Paduch R., Wawrzyniak A., Łuszczewska-Sierakowska I., Zarzyka B., Gawron A. Oddziaływanie apigeniny z komórkami raka szyjki macicy i z krwinkami czerwonym człowieka. XLIX Sympozjum Polskiego

Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie. 9-12.09.2015. Międzyzdroje.

19. **Kapral J**., Pawlikowska-Pawlęga B., Misiak L.E., Gawron A., Gruszecki W.I. Interakcje apigeniny z liposomami DMPC i EYPC oraz naturalnymi białkowo-lipidowymi błonami krwinek czerwonych człowieka. XXII Lubelskie Warsztaty Biofizyczne. 2-3.06.2015. Kazimierz Dolny.

PRACA NA RZECZ UCZELNI I WYDZIAŁU

2013, 2016	Udział w organizacji **„Nocy Biologów" Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS**
2015-2017, 2019	Udział w organizacji **„Drzwiach Otwartych" Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS**
2016, 2019	Udział w **Lubelskim Festiwalu Nauki**
2015	Udział w organizacji w projekcie **„Objazdowy Festiwal Nauk czyli nauka bez barier "**

NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

- Nagroda zespołowa za wysoko punktowany artykuł naukowy opublikowany w 2020 roku (2020)

- Wyróżniony plakat pt. „ Wrażliwość komórek linii HeLa na działanie kwercetyny" na V Interdyscyplinarnym Seminarium Naukowym „Molekularne mechanizmy powstawania chorób nowotworowych" (2016)

- Wyróżniony plakat pt. „ Oddziaływanie apigeniny z komórkami raka szyjki macicy i krwinkami czerwonymi człowieka" na XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików. Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie (2015)